

Aus dem Institut für landwirtschaftliche Mikrobiologie
der Justus Liebig-Universität Giessen
Direktor: Prof. Dr. H. Glathe

**QUALITATIVE UND QUANTITATIVE MIKROBIOLOGISCHE
POPULATIONSENTERSUCHUNGEN AN UNTERSCHIEDLICH
VERGLEYTEN BÖDEN UNTER BESONDERER BERÜCK-
SICHTIGUNG DER ÖKOLOGIE UND PHYSIOLOGIE
EISENREDUZIERENDER BAKTERIEN**

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
bei der Landwirtschaftlichen Fakultät
der Justus Liebig-Universität
zu Giessen

vorgelegt von
Johannes Carl Gottlob Ottow
Madioen / Indonesien

Giessen 1969

Aus dem Institut für landwirtschaftliche Mikrobiologie
der Justus Liebig-Universität Giessen
Direktor: Prof. Dr. H. Glathe

**QUALITATIVE UND QUANTITATIVE MIKROBIOLOGISCHE
POPULATIONSENTSUCHUNGEN AN UNTERSCHIEDLICH
VERGLEYTEN BÖDEN UNTER BESONDERER BERÜCK-
SICHTIGUNG DER ÖKOLOGIE UND PHYSIOLOGIE
EISENREDUZIERENDER BAKTERIEN**

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

bei der Landwirtschaftlichen Fakultät

der Justus Liebig-Universität

zu Giessen

vorgelegt von

Johannes Carl Gottlob Ottow

Madioen / Indonesien

Giessen 1969

QUALITATIVE UND QUANTITATIVE MIKROBIOLOGISCHE
POPULATIONUNTERSUCHUNGEN AN UNTERSCHIEDLICH
VERGLEYTEN BÖDEN UNTER BESONDERER BEACHTUNG
SICHTUNG DER ÖKOLOGIE UND PHYSIOLOGIE
EISENREDUZIERENDER BAKTERIEN



Inaugural-Dissertation

Dekan: Prof. Dr. P. Meimberg

1. Berichterstatter u. Promotor: Prof. Dr. H. Glathe

2. Berichterstatter: Prof. Dr. E. Schönhals

Doktorexamen am: 17. 1. 1969

vorgelegt von

Johannes Carl Gottlob Graw

Medizin / Anatomie

Gießen 1969



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41545915_0050

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
VORWORT	
I. KAPITEL: Einführung in die Problematik	1
1.1. Problematik	1
1.2. Die Bedeutung des Wassers als pedogenetischer Faktor	1
1.3. Die Aktualitätsmerkmale der hydromorphen Böden	2
II. KAPITEL: Literatur	4
A. Die ökologischen Bedingungen der Eisenreduktion	4
2.1. Die pedogenetischen Formen der Eisenoxide im Boden	4
2.2. Aufbau der kristallinen Eisenoxide	5
2.3. Der Aktivitätsgrad der Eisenoxide	5
2.4. Die Eisenoxide der hydromorphen Böden und ihre Entstehungsbedingungen	6
2.5. Einfluß des Wassers auf die Eisenoxide und Redoxpaare	7
2.6. Eisenreduktion und Vergleyung	9
2.7. Eisenreduktion, organische Substanz und Redoxpotential	10
2.8. Die Thermodynamik der Eisenreduktion	11
B. Die Hypothesen der Eisenreduktion	14
2.1. Eisenreduktion durch organische Ligande	14
2.2. Die Reduktion der Eisenoxide durch reduzierende Substanzen mikrobiellen Ursprungs	16
2.3. Die Bedeutung der Wasserstoffionenkonzentration für die Eisenreduktion	17
2.4. Eisenreduktion und Sauerstoffspannung	19
III. KAPITEL: Material und Methoden	20
3.1. Die Charakterisierung der vergleyten bzw. pseudovergleyten Versuchsböden	20
1. Placierung der Leitprofile	20
2. Das Ausgangsmaterial	21
3. Kennzeichnung der Profile	21

	Seite
4. Methoden der chemisch-physikalischen Boden- untersuchungen	23
Bestimmung des pH-Wertes 23; Der Carbonatgehalt 23; Gesamtorganische Substanz 23; Colorimetrische Bestimmung des Kohlenstoffgehaltes 23; Der Gesamt- stickstoffgehalt 23; Nitratbestimmung 23; Ammoniak- bestimmung 23; Kennzeichnung der pedogenen Eisen- oxide 23.	
5. Methoden der mikrobiologischen Populationsanalytik	
A. Quantitative Methoden	24
5.1. Das Gußplattenverfahren nach Koch	24
a. Medien zur Ermittlung der Gesamtflora der Bakterien	25
b. Selektivnährböden	25
Bestimmung des Azotobacter-Vorkommen 25; Bestimmung der oxalatabbauenden Bakterien 25; Bestimmung heterotropher Eisen(III)-Chelate abbauender Bakterien 25.	
5.2. Die Methode der Grenzverdünnung zur Ermittlung der MPN	25
MPN der eisenimmobilisierenden Bakterien 26; MPN der eisenreduzierenden Bakterien 26; MPN der anaeroben, eisenreduzierenden und stickstoffbindenden Clostridien 28; MPN der sulfatreduzierenden Bakterien 28; MPN der Bakterien, die organische Schwefel- verbindungen mineralisieren 28; Die Bestimmung der potentiellen Zellulosezersetzungsaktivität 29; MPN der Säurebildung bzw. Gasbildner 29; MPN der dissimilatorischen nitratreduzierenden Bakterien 29.	
5.3. Ermittlung der Aktivitätskurven der dissimilato- rischen Nitratreduktion, Nitritbildung, Gasbildung, Säureproduktion und Eisenreduktion.	29
5.4. Nährböden zur quantitativen Ermittlung der Zahl an Pilz-, Actinomycceten- und Algeneinheiten	30
Nährböden für Pilze 30; Nährböden für Actinomy- ceten 30; Nährböden für Pilze und Actinomycceten 30; MPN der Bodenalgcn 30;	
5.5. Standardagar und Zubereitung von Bodenextrakt	31
B. Qualitative Analyse zur Isolierung eisenreduzierender Bakterien	32

5.6.	Isolierung eisenreduzierender Bakterien aus vergleyten Horizonten	32
5.7.	Morphologische und biochemische Differenzierung der isolierten Stämme	32
3.2.	Einfluß eisenreduzierender Bakterien auf Eh, pH, Eisenreduktion und Vergleyung in künstlich überfluteten Böden	34
3.3.	Die Testorganismen	36
3.4.	Methoden zur Bestimmung der mikrobiellen Eisenreduktion	37
1.	Die qualitative Bestimmung der potentiellen Kapazität Eisen zu reduzieren	37
2.	Die quantitative Bestimmung der potentiellen Kapazität Eisen zu reduzieren	37
3.5.	Die Isolierung und Züchtung von Nitrat-Reduktase negativen (nit^-) Mutanten aus eisenreduzierenden Bakterien	38
1.	Prinzipielle Grundlage; 2. Methodik.	
IV.	KAPITEL: Ergebnisse der Untersuchungen	41
I.	Charakterisierung der Pseudogley-Braunerde, des Pseudogleys und des Gleys	41
4.1.	Chemisch-physikalische Untersuchungen	41
4.2.	Quantitative mikrobiologische Untersuchungen	45
A.	Differenzierung durch quantitative Populationsuntersuchungen	45
1.	Verteilung der Bakterien	45
	Einfluß der Lagerungsdauer auf den Bakterienbesatz der Proben	48
2.	Verteilung der Actinomyceten und Pilze	49
	Zum Problem der quantitativen Erfassung von Actinomyceten und Pilzen mit Bengalrosa-Malzextrakt Agar	50
	Varianzanalytische Überprüfung der Unterschiede und Genauigkeit zwischen Bengalrosa-Malzextrakt Agar und Glycerin-Glykokoll Agar	53
3.	Die Verbreitung der Bodenalgae	53
B.	Differenzierung aufgrund einiger physiologischer Gruppen der Bodenbakterien	54
1.	Einfluß regionaler Milieufaktoren auf die Verbreitung von aeroben und anaeroben Bakterien	56

2. Die Mikrobiologie des Eisenkreislaufes	58
Die Verbreitung der eisenmineralisierenden Bakterien	58
Vorkommen der potentiellen eisenreduzierenden Flora	61
Die Differenzierung der eisenreduzierenden Bakterien	61
3. Beziehung zwischen Eisenreduktion, Säurebildung und Gasentwicklung	67
4. Eisenreduktion und dissimilatorische Nitratreduktion	68
4.3. Qualitative mikrobiologische Untersuchungen: Diagnostik der isolierten, eisenreduzierenden Bakterien aus vergleyten bzw. pseudovergleyten Bodenzonen	69
1. Differenzierung und Identifizierung der Gram-negativen Bakterien der Gruppe O/F = +/-	70
Die Variabilität in der Gattung <u>Pseudomonas</u>	77
2. Differenzierung und Identifizierung der eisenreduzierenden Bazillen	77
3. Differenzierung der Gram-negativen Bakterien der Gruppe O/F = -/-	81
4. Auffallende biochemische Leistungen der isolierten Bakterien im Zusammenhang mit der eisenreduzierenden Kapazität	83
II. Die Ökologie der eisenreduzierenden Bakterien	85
4.1. Intensität und Umfang der Eisenreduktion in künstlich überfluteten Böden	85
4.2. Der Bereich des Redoxpotentials	88
4.3. Veränderungen in der Wasserstoffionenkonzentration	88
4.4. Eisenreduktion und Gleybildung	89
III. Die Physiologie der eisenreduzierenden Mikroorganismen	89
4.1. Die Verbreitung der Fähigkeit Eisen zu reduzieren unter den Mikroorganismen	89
4.2. Die quantitative Bestimmung der Kapazität Eisen zu reduzieren	93
4.3. Eisenreduktion und reduzierende Substanzen	96

	Seite
4.4. Einfluß von Wirkstoffen auf die bakterielle Eisenreduktion	98
1. Einfluß von Bodenextrakt	99
2. Einfluß von Hefewachstumsfaktoren	100
4.5. Einfluß der Eisenoxidform auf die Eisenreduktion	102
4.6. Einfluß des pH-Wertes auf die Eisenreduktion	103
4.7. Der biochemische Mechanismus der bakteriellen Eisenreduktion	106
1. Einfluß von Nitrat auf die Eisenreduktion	106
2. Einfluß von Chlorat auf die Eisenreduktion	108
3. Einfluß von Sulfat auf die Eisenreduktion	109
4.8. Eisenreduktion bei nit ⁻ Mutanten eisenreduzierender Wildstämme	110
1. Charakterisierung der isolierten nit ⁻ Mutanten	111
2. Die Kapazität der Eisenreduktion von nit ⁻ Mutanten	112
V. KAPITEL: Diskussion	115
Zusammenfassung	128
Summary	131
Literaturverzeichnis	134
Curriculum vitae	

Si tu donne un poisson à un homme,
il se nourrira une fois
Si tu lui apprends à pêcher,
il se nourrira toute sa vie

Kuan-tzu

Vorwort

Beim Erreichen dieses Marksteins ist es mir ein besonderes Anliegen jenen zu danken, denen ich so entscheidendes im Laufe meiner Ausbildung verdanke.

Liebe Eltern, wesentlich für meine Bildung und für den Erfolg war vor allem Eure Bereitschaft meine nicht immer verständlichen Abenteuer tatkräftig und rätend zu unterstützen. Für das große Vertrauen danke ich Euch nicht weniger als für das Moment der Weltoffenheit in Eurer Erziehung. Dies entspricht wohl Eurer humanistischen Lebensauffassung, in der die Freiheit des Einzelnen und die Toleranz dem Anderen gegenüber zum Träger von Respekt vor allem was lebt und blüht wurde.

Ihnen, sehr geehrter und geschätzter Lehrer und Promotor, Herr Prof. Dr. H. Glathe, danke ich von Herzen für Ihre langjährige Betreuung, wissenschaftliche Anleitung und immer spontane Unterstützung meines Studiums, vor allem aber für das Vertrauen, das Sie mir großzügig erwiesen. Als Stipendiat der Stiftung Volkswagenwerk habe ich es als eine Ehre empfunden, Ihr Institut und die Landwirtschaftliche Fakultät der Justus Liebig-Universität Giessen in den U.S.A. vertreten zu dürfen.

Sehr geehrter Herr Professor, gerade in Ihrem Institut habe ich die Freiheit der Wissenschaft und die Würde des Menschen als oberstes Gebot schätzen gelernt.

Herrn Prof. Dr. E. Schönhals, Direktor des Instituts für Bodenkunde und Bodenerhaltung, sowie Herrn Dr. T. Harrach, wiss. Assistent an diesem Institut, danke ich für die Hilfe bei der Auswahl der Profile, sowie für das besondere Interesse am Fortgang dieser Arbeit.

Dear Professor Harris, I feel greatly indebted to you and all members of the bacteriology-staff, Department of Bacteriology, Kansas State University, U.S.A., for the invaluable experiences gained, and the concise, but painstaking bacteriological education. I want to thank you all for that special hospitality that I enjoyed in Manhattan, Kansas.

An dieser Stelle möchte ich ferner der Herren Ir. M. van Bottenburg und Studienrat R. van der Woude gedenken, die am Anfang meiner Ausbildung in kritischen und entscheidenden Momenten durch Verständnis, Überzeugung und mit guten Ratschlägen zu fördern wußten. Mit besonderer Dankbarkeit in diesem Zusammenhang erfülle ich hier meinen Wunsch, des verstorbenen Herrn Ir. P. Hus zu gedenken.

Auch möchte ich die Gelegenheit benutzen, allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für landwirtschaftliche Mikrobiologie für ihre herzliche Aufnahme und stete Hilfsbereitschaft meinen Dank auszusprechen. Ein Dankeswort gilt Frau Dr. A. von Klopotek für ihr herzliches Entgegenkommen und geschätzte Freundschaft. Dank schulde ich aber vor allem Fräulein E. Vogt für die gewissenhafte technische Mitarbeit und die Anfertigung der Aufnahmen.

Liebste Helga, ich danke Dir von ganzem Herzen für Deine in jeder Hinsicht aufopfernde Hilfsbereitschaft beim Zustandekommen dieser Arbeit.

Mein aufrichtiger Dank gilt weiter dem Deutschen Akademischen Austauschdienst, Bad Godesberg für die großzügige Unterstützung meines Studiums an der Universität Giessen. Nicht weniger verpflichtet bin ich der Stiftung Volkswagenwerk, Hannover, die mir das gewünschte Spezialstudium der Mikrobiologie in den U.S.A. ermöglichte. Aber auch der Deutschen Forschungsgemeinschaft, Bad Godesberg, möchte ich ganz besonders danken. Mit ihrer Unterstützung konnte die vorliegende Forschungsarbeit durchgeführt werden.

I. KAPITEL

Einführung in die Problematik

1.1. Problematik

Die Charakteristik der hydromorphen Böden (Gleye und Pseudogleye) liegt bei den grau-blau verfärbten Horizonten der vom Grundwasser oder Staunässen beeinflussten Zonen des Profils. Diese Horizonte verdanken ihre Prägung der Akkumulation reduzierter Eisen(II)-Verbindungen. In der Frage, ob und welche Mikroorganismen bei der Transformation pedogener Ferrioxide in die Ferroverbindungen eine Rolle spielen, sowie in der Ergründung des biochemischen Mechanismus dieses Vorganges, liegt das Wesen der gestellten Aufgaben.

1.2. Die Bedeutung des Wassers als pedogenetischer Faktor

Als hydromorphe Böden werden konventionell nur solche Böden bezeichnet, deren Profilgepräge vorherrschend durch die Wirkung stagnierenden Wassers gestaltet ist. In den Pseudogleyen, "Marmorierten Böden" und Stagnogleyen wird das Wasser über einem Staukörper nur zeitlich und räumlich begrenzt, während in den echten Gleyen ¹⁾ das zeitlich und räumlich unbegrenzte Grundwasser mit durchgehendem Spiegel vorliegt. Diese unterschiedliche Einwirkung des stagnierenden Wassers löst verschiedene Prozesse aus, die zu charakteristischen Merkmalen und zur Genese unterschiedlicher Bodentypen führen. Ihnen gemeinsam ist jedoch der Vorgang der Vergleyung, der durch den vorherrschenden Einfluß des Faktors Wasser bei der Pedogenese ausgelöst wird. Trotzdem wird diesem Faktor in der Bodenkunde eine unterschiedliche Bedeutung beigemessen, obwohl Gleye und Vergleyungserscheinungen in allen gemäßigten humiden oder perhumiden Klimabereichen, sowie in überfluteten Böden auftreten können.

In der deutschen Bodensystematik werden die hydromorphen Böden in Anlehnung an KUBIENA (1953), ohne Verwendung des Wortes "hydromorph", den terrestri-

- 1) Der Ausdruck "Gley" stammt aus dem russischen und ist eine volkstümliche Bezeichnung für einen reduzierten Schlamm.

schen, semiterrestrischen und subhydrischen Böden zugeteilt. Nach MÜCKENHAUSEN (1962) werden die Pseudogleye und Stagnogleye, obwohl sie ihre Entstehung der Wirkung des stagnierenden Wassers verdanken, zu den terrestrischen Böden gerechnet, während die Auen, Marschen und echten Gleye zu den semiterrestrischen Böden gehören. Als Einteilungskriterium für die pedogenetischen Vorgänge ist hier das Wasser anscheinend noch sekundär. Auch nach der physiographischen Bodensystematik der niederländischen Schule, die basiert ist auf den morphometrischen Kriterien von EDELMAN, wird der Einfluß des Wassers erst in der Subordnung bewertet (STEUR, 1959).

Erst in der englischen Systematik von AVERY (1956) und bei den französischen Prinzipien von DUCHAUFOR (1965), sowie nach der russischen Auffassung von VOLOBUYEV (1964) wird der Gestaltungskraft des Wassers bei der Klassifizierung größere Bedeutung eingeräumt und alle hydromorphen Böden den nichthydromorphen Bodentypen in der obersten Kategorie des Systems gegenübergestellt. Demgegenüber stehen die modernen Ansichten der amerikanischen Bodenkundler. In dem amerikanischen System des 7th approximation (1960) wird hinsichtlich der hydromorphen Böden das genetische Prinzip weitgehend verlassen und dem Aktualitätsprinzip gefolgt, bei dem nicht die Entstehung der Böden, sondern nur ihr aktueller Zustand bewertet und zur Klassifizierung herangezogen wird. Dieser Auffassung liegt die Überlegung zugrunde, daß nach Ausschaltung des Faktors Wasser die Pedogenese des Bodens zum Stillstand kommt, und damit die vom Wasser ausgelösten Prozesse ausgeschaltet werden.

1.3. Die Aktualitätsmerkmale der hydromorphen Böden

Wird ein Boden von Wasser überflutet oder von Staunässen beeinflusst, so kommt es neben der visuellen Vergleyung vielfach zu folgenden Begleiterscheinungen:

1. Ein Absinken des Redoxpotentials (Eh),
2. Eine Veränderung des pH-Wertes,
3. Eine progressive Zunahme an löslichen Eisen(II)-Verbindungen und
4. Gasbildung (Kohlendioxid, Wasserstoff und Methan), sowie eine anschließende Anhäufung von organischen Säuren (Buttersäuregeruch).

Bei diesen Reduktionsprozessen besteht die Wirkung des Wassers wahrscheinlich darin, das recidierende Agens, den Sauerstoff zu verdrängen. Weiter neigt man vielfach dazu, die Mikroorganismen des Bodens und dessen organische Substanz für die charakteristischen Erscheinungsbilder, zu denen die Reduktionsprozesse führen, verantwortlich zu machen. Daß unter Umständen gewisse Bestandteile der Humusstoffe reduzierend wirken und sich so potentienetrisch bemerkbar machen, ist anhand von Redoxtitrationen der Fulvosäuren aus Tschernosemen erwiesen (KARBACH, 1961). Die Bedeutung dieser letzteren Prozesse muß jedoch bis zu etwa 1 m Tiefe als sehr gering betrachtet werden, zumal die lösliche organische Substanz auf dem Transport in den Unterboden der mikrobiellen Zersetzung unterliegt. Wenn aber andererseits noch unbekannte, spezifische Mikroorganismen (Bakterien, Pilze, Actinomyceten oder Algen) verantwortlich für die Vergleyung zu machen sind, so müssen jene Organismen ubiquitär auftreten, um die weltweite Verbreitung der Vergleyung in Gleyen, Pseudogleyen, Reisböden und Sümpfen erklären zu können. Folgende Teilfragen wären in diesem Zusammenhang zu beantworten:

1. Gibt es eisenreduzierende Bakterien?
2. Wenn ja, wie ist diese Flora qualitativ und quantitativ zusammengesetzt?
3. Sind Vertreter dieser eisenreduzierenden Bakterien in der Lage unter Erniedrigung des Redoxpotentials eine Vergleyung im Labor herbeizuführen?
4. Welche ökologischen Bedingungen müssen erfüllt sein, um eine Vergleyung zu ermöglichen?
5. Welche physiologischen Mechanismen sind für die bakterielle Eisenreduktion verantwortlich?

In der vorliegenden Arbeit wird versucht auf diese Fragen durch Ergebnisse von Experimenten eine Antwort zu geben.

II. KAPITEL

Literatur

A. Ökologische Bedingungen der Eisenreduktion

2.1. Die pedogenetischen Formen der Eisenoxide im Boden

Die Oxide und Hydroxide des Eisens sind im Boden als das dominierende, anorganische Redoxsystem zu betrachten. Mehr noch als die Tonminerale, sind die Eisenoxide pedogen, da sie einerseits direkt aus den primären Mineralen entstehen und andererseits im Profil eine starke Tendenz zur Verlagerung aufweisen. Die typischen Merkmale mancher Böden beruhen oft auf den Unterschieden in Form, Farbe und Verteilung der abgelagerten Eisenoxide. Aber auch innerhalb des Bodenprofils wird die Erscheinungsform des Eisens zur Deutung pedogenetischer Prozesse herangezogen. Die Variabilität der Eisenoxide und Verbindungen entstammen im wesentlichen seinen beiden charakteristischen Eigenschaften, nämlich 1. der Fähigkeit zum Valenzwechsel und 2. der Tendenz, Chelate und Komplexe mit organischen Stoffen zu bilden. Im Boden sind gerade diese Eigenschaften verantwortlich für die pedogenetisch wichtigen Vorgänge der Mobilisierung, Verlagerung und lokalen Anreicherung der Eisenverbindungen.

Eisen in ionischer Form tritt im Boden nur unterhalb pH 3.4 auf und ist somit in den meisten Böden in austauschbarer Form am Sorptionskomplex nicht vorhanden. Auch das Lösungsprodukt von Eisen(III)-Hydroxid ist unter neutralen Bedingungen auf etwa 10^{-38} abgesunken und als Lieferant von Eisenionen bedeutungslos. Die Neuentstehung von Eisenoxiden ist demnach hauptsächlich abhängig von der Oxidation der in Lösung befindlichen Ferroionen. Welche Eisenoxidformen entstehen, hängt letzten Endes von den Miliefaktoren und Alterungsbedingungen ab, darunter vor allem von der Fällungsgeschwindigkeit, vom Säuregrad, vom Partialdruck an Kohlendioxid, vom Wassergehalt, von der Menge und Art der organischen Substanz, und nicht zuletzt vom Redoxpotential. Kommt es zu einer Fällung von Eisenoxiden, so entsteht zunächst ein röntgenamorphes Eisen(III)-Oxidgel, das allmählich zu den kristallinen Eisenoxidformen altert. Als Endformen wurden im Boden am häufigsten die Strukturen von $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ (Hämatit), $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ (Maghemit), $\alpha\text{-FeOOH}$ (Goethit), $\gamma\text{-FeOOH}$ (Lepidokrokit) und das hydrierte Eisenoxid $\text{Fe}(\text{OH})_3$

nachgewiesen (OADES, 1963). In der Natur entsteht die α -Reihe (Goethit und Hämatit) viel häufiger als die γ -Reihe (Lepidokrokit und Maghemit), weil die Vertreter der α -Reihe einen geringeren Energiegehalt als die entsprechenden Vertreter der γ -Reihe besitzen (LUDWIEG, 1956). So kann sich Goethit unter Aufnahme von 2 Kcal/Mol in Hämatit verwandeln, während Lepidokrokit 4 Kcal/Mol aufnehmen muß, um zu Maghemit umgewandelt zu werden. Hämatit braucht 8 Kcal/Mol zur Transformation zum energiereichsten Eisenoxid, dem Maghemit, das aber im Boden nur vereinzelt auftritt.

2.2. Aufbau der kristallinen Eisenoxide

Eisenoxidhydrate bestehen aus dichtgepackten Sauerstoffgittern, die beim Goethit und Lepidokrokit durch Hydroxylgruppen etwas aufgeweitet und deformiert sind. Bei den genannten Eisenoxiden besteht das Kristallgitter aus Fe-OH -Oktaedern, bei Hämatit dagegen aus Fe_2O_3 -Tetraedern. Die Eisenatome befinden sich in den oktaedrischen bzw. tetraedrischen Hohlräumen, welche die größeren Sauerstoffatome zwischen sich freihalten. Die Struktur von Lepidokrokit ist schichtförmig und durch H-Brücken zusammengehalten. Praktisch bedeutet diese Struktur eine erhöhte Spaltbarkeit des Lepidokrokits gegenüber Goethit und Hämatit (LUDWIEG, 1956). Im Boden liegt Lepidokrokit vielfach in blättchenförmiger Gestalt vor (BROWN, 1953), was eine erhöhte reaktive Oberfläche bedeutet. Goethit kommt dagegen häufig in nadelförmigen Kristallen vor.

2.3. Der Aktivitätsgrad der Eisenoxide

Da das Endprodukt der Alterung vom Milieu abhängig ist, wird das Verhältnis des amorphen zum kristallinen Anteil der Eisenoxide von Profil zu Profil verschieden sein. Schon ROBICHET (1957) stellte fest, daß durch Extraktion mit saurer Ammoniumoxalatlösung die "Hydroxide" sehr gut gelöst wurden, in Gegensatz zu den "freien Oxiden", die nur in unbedeutenden Mengen freigesetzt werden konnten. SCHWERTMANN (1964) stellte fest, daß die in Ammoniumoxalat bei $\text{pH} = 3$ extrahierbare Fraktion der Eisenoxide (Fe_o) sich vorzüglich als Maß für den röntgenamorphen Anteil des Gesamtgehaltes der Eisenoxide (als dithionitlösliches Fe , Fe_d) eignet, weil der nicht gelöste Teil mit dem röntgenographischen

und differentialthermoanalytisch bestimmten Goethitgehalt eng korreliert war. Die Differenz $\text{Fe}_d - \text{Fe}_o$ vermag daher eine Aussage über den Kristallisationszustand und Alterungsgrad der Eisenoxide zu vermitteln, während sich der sog. Aktivitätsgrad $\text{Fe}_o / \text{Fe}_d$ zur pedogenetischen Charakterisierung verschiedener Bodentypen als besonders brauchbar erwies (SCHWERTMANN, 1965; McKEAGUE und DAY, 1966).

2.4. Die Eisenoxide der hydromorphen Böden und ihre Entstehungsbedingungen

Die Entstehungsbedingungen der Eisenoxidformen wurden in den letzten Jahrzehnten eingehend studiert (vgl. ROBICHET, 1957; SCHEFFER, WELTE und LUDWIG, 1958; SCHWERTMANN, 1965; BLUME, 1968). Im allgemeinen führt eine langsame Fällung bei niedrigem pH-Wert und niedriger Temperatur zur Ausflockung von Goethit, während eine schnelle Oxydation der Ferroionen zu einem voluminösen, amorphen Eisengel führt, das bei alkalischer Reaktion weiter zu Goethit, bei neutraler oder saurer Reaktion über Hydrohämätit zum Hämatit altert (FEIT-KNECHT und MICHAELIS, 1962; SCHWERTMANN, 1965). Daß die Entstehungsbedingungen der Kristallisationsformen in hohem Maße komplex sind, wies SCHELLMANN (1959) nach, als er die Bildung von Goethit unter dem Einfluß von den Anionen HCO_3^- und SO_4^{2-} sowohl bei hohem als auch im neutralen pH-Bereich beobachten konnte. Aber auch Hämatit entstand unter neutralen Bedingungen, wenn Mg^{2+} , Ca^{2+} und Al^{3+} -Ionen in der Lösung vorhanden waren (GASTUCKE et al., 1964; TAYLOR und GRALEY, 1967). Die Ionen Na^+ , K^+ , Cl^- und NO_3^- hatten keinen Einfluß auf die Alterung. Umgekehrt würden diese Befunde bedeuten, daß mit zunehmender Entbasung aufgrund starker Entwicklung von Kohlendioxid die Tendenz zur Goethitbildung vorherrschen müßte. Die Bedeutung der Kohlensäurekonzentration für die Alterungserscheinungen wurde in Laboruntersuchungen von SCHWERTMANN (1964) nachgewiesen. Während sich bei geringer Kohlensäurekonzentration durch Oxydation von Ferroionen und FeS vor allem Lepidokrokite bildet, scheidet sich bei hoher Konzentration von CO_2 hauptsächlich Goethit aus. Hierauf wäre das Vorkommen von Goethit in den meisten staunassen Böden zurückzuführen (SCHROEDER und SCHWERTMANN, 1955).

2.5. Einfluß des Wassers auf die Eisenoxide und Redoxpaare

Das Auftreten von reduzierten Eisenverbindungen ist eng verbunden mit dem Grad der Wassersättigung des Bodens. STINGĂ, SILVA et al. (1960) z.B. stellten in Gleyen eine eindeutige Abhängigkeit des $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ -Verhältnisses vom Wassergehalt fest. Bei einer Abnahme des Wassergehalts von 100 % auf 20 % stieg der $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ -Quotient von 7.2 auf 13.7. In den hydromorphen Böden muß man dann auch grundsätzlich zwischen Eisenformen des wechselfeuchten und des vom Wasser mehr oder weniger permanent beeinflussten Horizontes unterscheiden.

Der Einfluß des periodisch auftretenden Wassers auf die Alterung der gefällten Eisenoxide ist den Untersuchungen von BROWN (1953, 1954) an "mottled clay" verschiedener vergleyter Böden Englands zu entnehmen. In den braunen Flecken der Marmorierungen wurden hauptsächlich Eisen(III)-Oxide (Lepidokrokit) registriert, während die blaßgrauen Partien frei von Fe^{3+} waren. Goethit, wenn überhaupt vorhanden, kam nur in den oberflächennahen Zonen vor. BROWN kommt zu dem Schluß, daß eine langsame Oxydation unter Wassereinfluß die Kristallisation von Lepidokrokit begünstigt, während eine stärkere Durchlüftung zum Goethit führt. Diese Folgerung wurde in dem Sammelreferat von SCHEFFER, WELTE und LUDWIEG (1958) so gedeutet, daß Lepidokrokit im Boden vorwiegend dann entsteht, wenn bei langsamer Ausfällung sowohl Fe(II)- als auch Fe(III)-Ionen vorhanden sind. Diese Voraussetzungen sind besonders in Stauwasserböden, aber auch in rezenten Gleyen gegeben. Doch identifizierte SCHWERTMANN (1959) mittels röntgenographischer und differentialthermoanalytischer Untersuchungen in den untersuchten Grundwasserböden neben röntgenamorphen Komponenten meist Goethit. Diese unterschiedlichen Befunde könnten sehr wohl durch verschiedene Entstehungsbedingungen besonders in der Kohlensäurekonzentration, erklärt werden.

Die Gleye und Pseudogleye unterscheiden sich eher aufgrund des Habitus ihrer Eisenakkumulationen. So werden in Pseudogleyen bevorzugt Konkretionen gebildet, während sich in den Gleyen vielfach typische röhrenförmige Gebilde oder Flocken abscheiden (BLÜMEL, 1962). Die Bildung von Eisenanreicherungen (Eisenstein, Konkretionen) wird durch den periodischen Wechsel der Naß- bzw. Trockenphase in der Übergangszone zwischen Oxydations- und Reduktionshorizont ausgelöst.

Die in der Naßphase reduzierten Eisenverbindungen werden in der Trockenperiode auf chemischem Wege (als Folge einer Oxydation, durch höhere pH- oder Eh-Werte, vgl. BLUME, 1968) oder von heterotrophen Mikroorganismen (PRINGSHEIM, 1949; ARISTOVSKAYA, 1958), vielfach unter Sorption von Metallionen (neben Mn auch P, Al und Mo; GEREI, 1958; REISENAUER et al., 1962) ausgefällt.

BLOOMFIELD (1951) ist der Auffassung, daß die Eisenakkumulation durch Fixierung und Oxydation von zweiwertigen Eisenverbindungen an vorhandenen Eisen(III)-Oxiden verursacht wird. Wäre diese Hypothese richtig, müßten Bodenproben, reich an Eisenoxiden (als Fe_d) mehr Fe^{2+} fixieren als Proben mit einem niedrigen Gehalt an freien Oxiden. McKEAGUE (1966) konnte jedoch keine Beziehung zwischen der Fe_d -Konzentration und der Sorption von Eisen feststellen. Frisch ausgefällte Eisenhydroxide sorbierten kein Eisen, Goethit und Hämatit nur in geringen Mengen. Auch BLUME (1968) setzte sich mit der Entstehung von Konkretionen in vergleyten Böden theoretisch auseinander. Er vertritt die Hypothese, daß gelöstes Eisen an den Randpartien von Aggregaten oder größeren Hohlräumen bei Wassersättigung unter Reduktion ins Aggregatinnere wandert und durch Oxydation während der Trockenphase zur Ausfällung gebracht wird. Tritt bei diesem Vorgang die Luft rasch ein, dann entstehen Konkretionen, während bei gehemmter Belüftung eher Rostflecken auftreten würden.

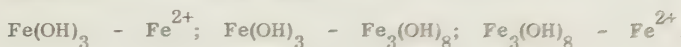
Die Frage, welche Eisenverbindungen und Redoxpaare in dem von Staunässen oder Grundwasser reduzierten, grauen Horizont dominieren, ist je nach der Konzentration der Nährstoffe unterschiedlich zu beantworten. Da eine Vergleyung durchaus nach dem Einsetzen der Verwitterung anfängt, sind Eisen(III)-Oxide als Ausgangsprodukt der reduzierten Verbindungen zugrunde zulegen und Reaktionsprodukte von Ferri- und Ferroionen zu erwarten. Als Mischverbindung konnten dann auch Ferro-Ferrihydroxid ($\text{Fe}_3(\text{OH})_8$, ein hydratisierter Abkömmling von Fe_3O_4), und womöglich $\text{Fe}_4(\text{OH})_{10}$ (ein dunkel gefärbtes Komplex aus $\text{Fe}_3(\text{OH})_8$ und gelösten Ferroionen) im Reduktionshorizont überfluteter Reisboden beobachtet werden (PONNAMPERUMA et al., 1967). In den vergleyten Horizonten hydromorpher Böden wurden neben dem hydratisierten Eisen(II)-Ion (dem $(\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_6)^{2+}$), die festen Oxide FeCO_3 (Siderit) und FeS (Pyrit) nachgewiesen. Voraussetzung zur Ausfällung von Carbonaten ist jedoch, daß reichlich Kohlendioxid bei der Zersetzung organischer Substanzen freigesetzt wird, während die Abscheidung von Eisensulfid an sulfatreiche Standorte gebunden ist (SCHWERTMANN, 1961).

Vivianit ($\text{Fe}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$), eine blaugraue Verbindung, wurde ebenfalls nur vereinzelt in vergleyten Böden beobachtet (MÜCKENHAUSEN, 1962) und spielt demnach bei der Prägung des Gesamtprofils eine untergeordnete Rolle. Somit sind das grün-graue $\text{Fe}_3(\text{OH})_8$ und das dunkle $\text{Fe}_4(\text{OH})_{10}$ vermutlich die wichtigsten Ferrokomplexe in den vom Wasser beeinflussten Zonen vieler hydromorpher Böden.

ARDEN (1950) stellte die Bildung von dem grünen Ferro-Ferrinhydroxid etwa folgendermaßen dar:



Für diese Verbindung konnte ein Lösungsprodukt von $6,4 \times 10^{-18}$ errechnet werden. Dieser Wert stimmt tatsächlich gut überein mit der Konzentration an zweiwertigen Eisenionen in bewässerten Reisböden (PONNAMPERUMA et al., 1967). Nach Meinung dieser Forscher sind die wichtigsten Eisenredoxsysteme in vergleyten Zonen, welche einen hohen Gehalt an Eisenoxiden und eine geringe Konzentration an Sulfaten, Phosphaten und organischer Substanz aufweisen, aus folgenden Redoxpaaren zusammengesetzt:



2.6. Eisenreduktion und Vergleyung

Wenn auch die Eisenoxide und Redoxpaare der vergleyten Zonen wassergetriggelter Böden zumindest teilweise ergründet worden sind, so bleibt doch die Frage nach der Entstehung der entscheidenden Ferroxone noch unentschieden. Wird ein Boden überflutet oder von Staunässe und Grundwasser beeinflusst, so setzen charakteristische Prozesse ein. Nach TAKAI, KOTYAMA und KAMURA (1966, 1968) kann man dabei zwischen zwei aufeinanderfolgenden Phasen unterscheiden. In der ersten Entwicklungsperiode direkt nach der Wassersättigung kommt es zur

1. Erschöpfung des Sauerstoff- und Nitratgehaltes (AOMINE, 1962);
2. progressiven Erhöhung an reduzierten Mineralen, besonders Ferro- und Manganionen (CLARK und RESNICKY, 1956; NG und BLOOMFIELD, 1962; SAVANT und ROSCOE, 1964);
3. Verminderung des Redoxpotentials (KARBACH, 1961; RODRIGO und POLLARD,

1962);

4. Veränderung der Wasserstoffionenkonzentration und

5. Anhäufung von Kohlensäure und Bicarbonaten (PONNAMPERUMA et al., 1966, 1967).

Kennzeichnend für den Übergang zu der zweiten Phase wäre die Bildung von molekularem Wasserstoff, von Sulfiden und organischen Säuren. Diese Produkte sind als Hauptmerkmale der permanent reduzierten Unterwasserböden zu betrachten. Zur typischen grauen Vergleyung kommt es jedoch schon während der ersten Phase (MOTOMURA et al., 1963). Die Intensität der Vergleyung ist stark abhängig von dem benutzten Boden. Dabei schien die Form des vorhandenen Eisenoxids der wichtigste Faktor zu sein (McKEAGUE, 1965). Die Graufärbung an sich führen SIUTA (1960) sowie MOTOMURA und YAMANAKA (1963) auf die Sorption der reduzierten Ferroionen am Sorptionskomplex zurück, was zu einer verstärkten Verdichtung der Bodenstruktur führen kann (SKVORTSOV, 1957). Ein Teil der Ferroionen bleibt jedoch als Ferrobicarbonat wanderungsfähig in der Bodenlösung zurück und steigt dabei kapillar in die Oxydationszone auf (MANDEL, 1961).

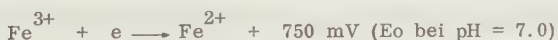
2.7. Eisenreduktion, organische Substanz und Redoxpotential

Wurde einem Boden organische Substanz in irgendeiner Form vor der Wassersättigung zugeführt, so erhöhte sich die Konzentration des reduzierten Eisens um ein Vielfaches im Vergleich zu den unbehandelten Proben (MANDEL, 1961; KARBACH, 1961; MOTOMURA, 1962; McKEAGUE, 1965). Gleichzeitig konnte eine verstärkte Abnahme des Redoxpotentials (Eh), beobachtet werden (McKENZIE et al., 1960; MATSUO et al., 1963; vgl. auch Sammelreferat von AOMINE, 1962). Schon BÉTRÉMIEUX (1951) berichtete von einer verstärkten Eisenreduktion, nachdem er im Labor Standgefäße mit Boden, vermischt mit verschiedenen Kohlenhydraten (Glucose, Stärke), Proteinen, (Albumin, Pepton) oder Luzernemehl, unter Wassersättigung bebrütete. Eisenreduktion trat auf, unabhängig davon, ob der Boden mit stickstoffreichen oder stickstoffarmen organischen Substanzen bebrütet wurde. Zur typischen Vergleyung kam es jedoch nur in den mit Glucose oder Stärke behandelten Bodenproben. Stickstoffreiche Verbindungen verhinderten zwar die typische Gleybildung, erhöhten jedoch die Reduktionsintensität beträchtlich.

Zu diesem Ergebnis kam auch DUCHAUFOR (1957), der in einem Boden, der mit leichtzersetzbarem, stickstoffreichem Humus gedüngt worden war, mehr Ferroionen nachwies, als in einem Boden, der mit einem Humus von weitem C/N Verhältnis vermischt worden war. Daher liegt die Versuchung nahe, die Beziehung zwischen der organischen Substanz einerseits, und der Bildung von Ferroionen und dem Abfall des Redoxpotentials andererseits, auf die "Tätigkeit" von Mikroorganismen zurückzuführen. Diese Erklärung wurde besonders von BLOOMFIELD (1950), YAMANAKA und MOTOMURA (1959) und KARBACH (1961) betont. Erst KAMURA et al. (1963) gelang es, die mikrobielle Ursache der Eisenreduktion experimentell nachzuweisen. Die Forscher stellten fest, daß die Reduktion des Eisens teilweise oder ganz unterblieb, wenn ein Sumpfreisboden unter Zusatz von Bakteriziden bebrütet wurde. Während KCN die mikrobielle Tätigkeit nur in einem bestimmten Konzentrationsbereich hemmte, verhinderten die Inhibitoren NaN_3 , HgCl_2 , Monojodessigsäure sowie Monofluoressigsäure die Reduktion vollständig. Weiter stellten KAMURA und Mitarbeiter in ihren Versuchen fest, daß der ^{14}C Gehalt der Methyl- und Carboxylgruppen des dem Boden zugesetzten Azetats, als Kohlendioxid wieder freigesetzt wurde. Die Forscher kamen zu dem Schluß, daß zwischen der Eisen(III)-Reduktion und dem mikrobiellen Stoffwechsel ein direkter Zusammenhang bestehen muß. Welche Bodenorganismen verantwortlich waren, wurde jedoch nicht untersucht.

2.8. Die Thermodynamik der Eisenreduktion

Falls Mikroorganismen das Absinken des Redopotentials verursachen, erhebt sich die Frage, bei welchem kritischen Wert die Transformation des Eisens vom dreiwertigen Zustand zum zweiwertigen erfolgt. Theoretisch betrachtet, muß das folgende thermodynamische Gleichgewicht erfüllt werden:



Dieser Wert des Standardpotentials wird von ROBICHET (1957) angegeben, während HEM und CROPPER (1959) einen Eo-Wert von 770 mV ermittelten. Die Redoxpotentiale hydromorpher Böden sanken im Höchstfall bis auf -375 mV im G_r -Horizont eines Gleys (SMIRNOVA, 1962) und bis auf etwa -350 mV im A_{hg} -Horizont eines Ton-Pseudogleys (BLUME, 1968), während ein Schwankungsbereich

von +300 bis -200 mV in Reisböden registriert wurde (MATSUO et al., 1963; AOMINE, 1962). Das Redoxpotential gut strukturierter, terrestrischer Böden liegt etwa im Bereich von +700 bis +800 mV (FLAIG, SCHARRER und JUDEL, 1955; BLUME, 1968). Diese Zahlen können so interpretiert werden, daß theoretisch nach erfolgter Wassersättigung mit einem Potentialsprung von etwa 1000 mV zu rechnen wäre, und eine Reduktion des Eisens durchaus möglich ist. Das Potential, bei dem nachweisbar die Reduktion des Eisens anfängt, wurde von MORTIMER und PEARSALL (1939) und AOMINE (1962) in stehenden Gewässern und Reisböden ermittelt (Tabelle 1).

Tabelle 1

Redoxpotentiale (mV) einiger wichtiger Redox-Systeme des Bodens

	MORTIMER u. PEARSALL	AOMINE
Sauerstoff-Reduktion	500 - 600	-
Nitrat-Reduktion	-	450 - 400
Ferri-Ferro-Reduktion	300 - 500	300 - 200
Sulfat-Reduktion	0 - 200	100 - 60
Bildung von H ₂ und CH ₄	-150 --200	-

Der Tabelle ist zu entnehmen, daß der kritische Grenzwert, bei dem das dreiwertige Eisen in die zweiwertige Form reduziert wird, eine große Variationsbreite aufweist. Dies läßt sich dadurch erklären, daß ein Redoxpotential solange einen relativen Meßwert darstellt, wie der pH-Wert des Bodens unberücksichtigt bleibt. Im allgemeinen sinkt nach einer Wassersättigung der pH-Wert in alkalischen Böden, während in ursprünglich sauren Böden mit einem Anstieg zu rechnen ist (PONNAMPERUMA et al., 1966). Erst wenn man Eh und pH in einer Größe vereinigt, erhält man vergleichbare Werte, die ein Maß für die Reduktionskraft eines Redoxsystems sind. HEWITT (1950) leitete z.B. die Nernst'sche Gleichung für ein biologisches Redox-System ab:

$$Eh = Eo + \frac{RT}{F} \ln \frac{(Ox)}{(Red)} - \frac{RT}{F} \ln \frac{Kd}{(H^+) + Kd}$$

Diese Gleichung zeigt die Abhängigkeit des Redoxpotentials (Eh) von der Dissoziationskonstanten Kd des betreffenden Redoxpaares und der Wasserstoffionenkonzentration. Entwickeln sich Bakterien in einem geschlossenen System, so entsteht ein Elektronendruck bzw. Elektronenzug, dessen Potential gemessen an einer Vergleichselektrode ein Maß für den Energieumsatz ist. Das gemessene Potential gegenüber einer Wasserstoff-Elektrode wird als Eh bezeichnet. Da aber für praktische Zwecke die Kalomel-Elektrode im Gebrauch ist, wird die $E_{\text{Kal.}}$ in Eh umgerechnet (IVES und JANZ, 1961):

$$Eh = E_{\text{Kal.}} + 240 \text{ mV } (30^{\circ} \text{ C})$$

Ein Redoxsystem kann jedoch auch im Gleichgewicht gedacht werden mit Wasserstoffgas bei 1 atü, der Wasserstoff-Elektrode. Die allgemeine Nernst'sche Formel für eine Wasserstoff-Elektrode ergibt:

$$Eh = E_0 + \frac{RT}{F} \ln \frac{(H^+)}{(H_2)^{1/2}}$$

weil folgendes Gleichgewicht an der Elektrode denkbar wäre:



Da bei der Definition für eine Wasserstoff-Elektrode E_0 gleich 0 ist, lautet die Gleichung:

$$Eh = \frac{RT}{F} \ln (H^+) - 1/2 \frac{RT}{F} \ln (H_2)$$

Nach Umrechnung auf $\log_{10}$, und Einführung des Begriffs "Reduktions-Intensität", $rH = -\log (H_2)$, ergibt sich:

$$Eh = 0.03 (-2 \text{ pH} + rH), \text{ denn } \frac{2.3 \times RT}{2F} = 0.03$$

$$rH = \frac{Eh}{30} + 2 \text{ pH } (\text{bei } 30^{\circ} \text{ C; } Eh \text{ in mV})$$

Der Meßbereich der Reduktions-Intensität liegt zwischen 0 und 42.6. Unter vollständig reduzierten Bedingungen bei 1 atü Wasserstoff und Gleichgewicht zwischen Atmosphäre und dem Wasserstoff in Lösung, wird die $rH = -\log 1 = 0$. In einem wässrigen System bei vollständiger Oxydation, erreicht die rH den Wert 42.6, denn bei 1 atü Sauerstoffdruck ist die Wasserstoffspannung auf $10^{-42.6}$

zurückgegangen, weil unter diesen Bedingungen Wasser als vollständig in Wasserstoff und Sauerstoff dissoziiert betrachtet werden kann:

$$K = (H_2)^2 \times (O_2) = 10^{-85.2}$$

$$2 \times rH + rO = 85.2$$

$$rH = 42.6$$

Die Reduktions-Intensität, rH , ist ein quantitativer Index für den Redoxzustand im Milieu, und zwar unabhängig vom pH-Wert (RABOTNOVA, 1963).

B. Die Hypothesen der Eisenreduktion

2.1. Eisenreduktion durch organische Ligande

Schon BLOOMFIELD (1951) war der Auffassung, daß Eisenreduktion und Vergleyung zumindest teilweise durch Einfluß organischer Abbauprodukte pflanzlicher Natur entstehen können. Laborversuche ergaben, daß unter sterilen Bedingungen wasserlösliche, pflanzliche Extraktionsprodukte aus einem Oberboden die Auflösung und Reduktion der Eisenoxide verursachen können. Aber auch stark saure Extrakte verschiedener unzersetzter Pflanzen waren in der Lage die Eisenoxide des Bodens in Anwesenheit von Toluol und Chloroform zu mobilisieren (BLOOMFIELD, 1953), sogar noch bei neutralen Bedingungen. Im allgemeinen wurde Eisenoxid stärker gelöst von sterilen Extrakten aus Dicotylen, als aus Gymnospermen, und die reduzierte Eisenmenge war besser korreliert mit der titrierbaren Azidität, als mit dem pH-Wert der Extrakte (vgl. Arbeiten von LOSSAINT, 1959). Die eisenlösende und reduzierende Wirkung von sterilen Extrakten aus frischer und in Zersetzung begriffener organischer Substanz verschiedenster Natur war seitdem wiederholt das Objekt vieler Untersuchungen (vgl. Arbeiten von MUIR et al., 1964; JUSTE, 1965; BRUCKERT und JACQUIN, 1966; SCHNITZER und SKINNER, 1967). Dabei wurde festgestellt, daß es sich um chelatisierende und komplexbildende Verbindungen handelte. Als aktive Komponente isolierten MUIR et al. (1964) mehrere α -Hydroxycarboxylsäuren. Insgesamt konnten unter den verantwortlichen Liganden 3 Gruppen nachgewiesen werden:

1. aliphatische organische Säuren wie Äpfel-, Zitronen-, Oxal- und Bernsteinsäure;
2. die aromatischen Säuren, darunter Vanillin- und Parahydroxybenzoesäure sowie Gallussäure und
3. Fulvosäure.

Andererseits scheinen besonders die Tannine reduzierend zu wirken (HEM, 1960). Lösungen von diesem Alkaloid in Konzentrationen von 5-50 ppm reduzierten Eisen vollständig bei einem pH-Wert unterhalb von 4,0. Auch JUSTE (1965) fand, daß die Natur der organischen Säuren von Bedeutung war für den Mobilisierungseffekt. Die Intensität der Wirkung nahm in der folgenden Reihenfolge ab:

Oxalsäure > Ascorbinsäure > Zitronensäure > Essigsäure.

Bemerkenswert in dieser Reihe ist, daß unter gleichen Bedingungen und bei gleichem pH-Wert, Ascorbinsäure (ein Reduktionsmittel!) weniger Eisen mobilisierte als Oxalsäure. Dies bedeutet eine potentielle Mobilisierung des Eisens ohne vorherige Reduktion. LOSSAINT (1959) fand, daß etwa 20-40 % des zunächst nur komplexgebundenen Eisens allmählich in die Ferroform transformiert wurde. In Anbetracht der oben aufgeführten Ergebnisse scheint BLOOMFIELD's Hypothese der Vergleyung (1951), in der die Mobilisierung und Reduktion von Ferrioxiden durch Pflanzenextrakte während ihrer Durchwaschung im Profil als Ursache des Prozesses gedeutet werden, weiter bestätigt zu werden. Ob es jedoch im Bodenprofil zur Verlagerung organomineralischer Komplexe kommt, hängt zunächst von ihrer Stabilität und der mikrobiellen Aktivität des Bodens ab. Hinsichtlich des Verlagerungsausmaßes der Sesquioxide verhalten sich die Bodentypen unterschiedlich. So steigt der Gehalt an Sesquioxiden in den Podsolen und Parabraunerden mit zunehmender Tiefe (im B₂-Horizont) an, während er in den Braunerden ständig abnimmt (VAN SCHUYLENBORG, 1966). DOMMERGUES und DUCHAUFOUR (1965) betrachten das Vorkommen und die Tätigkeit einer bestimmten Mikroflora als entscheidend für die Intensität solcher Verlagerungsprozesse. So war in einem Mullboden die Aktivität der Mikroorganismen, welche den Abbau von Eisenchelaten und Komplexen bewirken (gemessen an der Gesamtpopulation der Ferriammoniumzitrat verwertenden Bakterien), größer als in dem für aerobe Organismen ungünstigen Moorboden (BRUCKERT und DOMMERGUES, 1966). In neutralen, biologisch aktiven Böden kann vermutlich das in Komplexform be-

findliche Eisen nicht beweglich sein, weil in den oberen Horizonten bereits die sofortige Zersetzung stattfindet. Zu den Mikroorganismen, die metallorganische Komplexe als einzige C-Quelle verwerten können, gehören außerdem Arten der ubiquitären Gattungen Aerobacter, Pseudomonas, Bacillus, Serratia und Corynebacterium. Aber auch Pilze, Actinomyceten und Amöben (besonders Limax sp.) verwerten den organischen Teil der Fe - organischen Komplexe unter Abscheidung von Eisenhydroxid als kleine Konkretionen (ARISTOVSKAYA, 1958). Ebenso sind die Chelate der Oxalsäure angreifbar und werden bei Arten der Gattungen Pseudomonas, Vibrio, Alcaligenes und Agrobacterium beobachtet (WAGNER, 1966). Besonders Flavobacterium extorquens wird bei der Verwertung metallorganischer Komplexe eine aktive Rolle zugeschrieben. Wenn auch Reduktion und Verlagerung des Eisens im Boden auf organisch-chemischem Wege möglich ist, so scheint doch ihre Bedeutung als Faktor bei der Vergleyung und Naßbleichung sehr fraglich zu sein.

2.2. Die Reduktion der Eisenoxide durch reduzierende Substanzen mikrobiellen Ursprungs

Obwohl auch CRAWFORD (1962) die Eisenreduktion durch pflanzliche Extrakte für möglich hält, betrachtet er vielmehr die Ausscheidung undefinierter, reduzierender Stoffwechselprodukte durch Mikroorganismen für die Transformation des Eisens als bedeutungsvoll. Tatsächlich wurde von russischen Forschern die Anhäufung von reduzierenden intermediären Stoffwechselprodukten bei Bakterien und Actinomyceten nachgewiesen (RABOTNOVA, 1961; GRECUSHKINA, NIKITINA und RABOTNOVA, 1965). Nach Auffassung von RABOTNOVA liegt die biologische Bedeutung der Bildung solcher "Reduktionen" darin, daß die Organismen damit den Zutritt von Sauerstoff zur Zelle regulieren können. Möglicherweise nehmen diese intermediären Stoffe bei geringem Sauerstoffpartialdruck im Milieu den bei der biologischen Oxydation gebildeten Wasserstoff auf, und geben ihm den Sauerstoff mit Verzögerung weiter.

Bei schlechter Belüftung könnte es so zur Akkumulation reduzierter Substanzen im Medium kommen. Im Boden könnte eine Oxydation dieser "Reduktionen" mit einer Reduktion von Eisenoxiden verbunden sein. Da dieses mikrobielle Stoffwechselprodukt weder dissimilatorische noch assimilatorische Funktionen besitzt, sondern

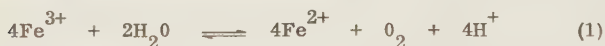
eine Anpassung darstellt, wurde sie als "akkomodativ" bezeichnet (RABOTNOVA, 1961). Bei 18 unter 50 untersuchten Bakterien entdeckte RABOTNOVA et al. (1963) besonders in einem glycerinhaltigen Medium die Bildung reduzierender Verbindungen vom Typ Dihydroxyaceton oder einer nahe verwandten Verbindung. Unter alkalischen bzw. sauerstofffreien Bedingungen wurden die Stoffwechselprodukte leicht zu einem "Redukton" enolisiert. Die Akkumulation und Abnahme von Dihydroxyaceton im Zentrifugat der Kulturflüssigkeit von Actinomyces aureofaciens war sogar korreliert mit dem Absinken und dem Ansteigen des Redoxpotentials im Medium. Eine Reihe von ubiquitär verbreiteten Arten von Bazillen, darunter B. cereus, B. brevis, B. megaterium, B. mesentericus, B. simplex und B. subtilis bildeten in geringerem Ausmaß auch reduzierende Verbindungen in glucose-, inosit- und mannithaltigen Nährlösungen. Bei B. mesentericus dagegen entstanden in einer dulzithaltigen Nährlösung keine reduzierenden Substanzen, obwohl die Reduktions-Intensität (rH) im Medium verstärkt wurde (GRECUSHKINA, NIKITINA und RABOTNOVA, 1965). Diese Forscher sind der Auffassung, daß die Erniedrigung des rH-Wertes in Kulturen von Sporenbildnern der Gattung Bacillus auf mindestens zwei Faktoren zurückzuführen ist: 1. auf die Akkumulation von intermediären, reduzierenden Substanzen und 2. auf den Sauerstoffverbrauch im Medium durch die wachsenden Mikroorganismen.

Die russischen Untersuchungen waren rein physiologischer Art und standen in keiner Beziehung zu der hier zur Diskussion stehenden Problematik. Es wäre aber zu prüfen, ob nicht "Reduktonen" bei der Reduktion der Eisenoxide eine Bedeutung beigemessen werden sollte.

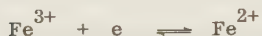
2.3. Die Bedeutung der Wasserstoffionenkonzentration für die Eisenreduktion

Der Begriff "Fermentation" umfaßt eine Gruppe energieliefernder Oxydations-Reduktions Prozesse, in denen organische Verbindungen als Elektronenakzeptor fungieren. Folge dieser unvollständigen biologischen Oxydation ist die Anhäufung organischer Säuren in der exponentiellen Vermehrungsphase der Mikroorganismen. Viele Mikroorganismen, besonders Enterobakterien und Bazillen, bilden beim Abbau von organischer Substanz Säuren, die den pH-Wert stark herabsetzen können. STARKEY und HALVORSON (1927), SYROCKI, FULLER und FRANCE (1937). ROBERTS (1947) sowie auch BÉTRÉMIEUX (1951) halten eine Reduktion von

Eisenverbindungen durch eine zunehmende Versauerung des Milieus für möglich. SYROCKI und Mitarbeiter (1937) stellten fest, daß in Kulturen von Aerobacter aerogenes in Anwesenheit von Eisen und dessen Reduktion der pH-Wert weniger stark abfiel als im Medium ohne Eisen. ROBERTS (1947) dagegen beobachtete eine stärkere Glucosefermentation durch Bacillus polymyxa bei Anwesenheit von Eisenoxid. Dabei wurden im eisenhaltigen Substrat mehr organische Säuren (Ameisen- und Milchsäure), aber weniger Kohlendioxid und molekularer Wasserstoff nachgewiesen. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen von SYROCKI et al. fanden auch STARKEY und HALVORSON (1927) eine höhere Wasserstoffionenkonzentration in Gärungen anaerob bebrüteter Bodenproben im Vergleich zu den mit Ferrioxid vermischten Ansätzen. Die Unterschiede der Ergebnisse dieser Versuche dürften in der Bebrütungsdauer liegen, die bei ROBERTS nach einer Woche abgebrochen wurden aber bei STARKEY und HALVORSON drei Wochen dauerten. Die Bedeutung der Wasserstoffionenkonzentration für das Reduktionsausmaß der Eisen(III)-Oxide wurde schon frühzeitig von STARKEY und HALVORSON (1927) theoretisch dargestellt, indem sie in einer wässrigen Lösung folgendes Gleichgewicht voraussetzten:



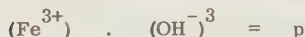
Thermodynamisch betrachtet ist das Wesen der Reaktion:



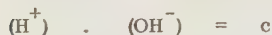
Durch Anwendung des Massenwirkungsgesetzes in Gleichung (1) erhält man:

$$\begin{aligned} (\text{Fe}^{3+})^4 &= K_o \cdot (\text{Fe}^{2+})^4 \cdot (\text{H}^+)^4 \cdot (\text{O}_2) \\ \frac{(\text{Fe}^{3+})}{(\text{Fe}^{2+})} &= K_o \cdot (\text{H}^+) \cdot (\text{O}_2)^{1/4} \end{aligned} \quad (2)$$

Das Löslichkeitsprodukt von Eisenhydroxid, $\text{Fe}(\text{OH})_3$, wird geschrieben:



während die Dissoziationskonstante des Wassers dargestellt wird als:



Durch Substituierung von $(\text{OH}^-) = \frac{c}{(\text{H}^+)}$ in p und

$$(\text{Fe}^{3+}) = \frac{p}{c} \cdot (\text{H}^+)^3 \quad \text{in (2) erhält man}$$

$$(\text{Fe}^{2+}) = K_o \cdot \frac{(\text{H}^+)^2}{(\text{O}_2)^{1/4}}$$

Aus dieser Beziehung ergibt sich die Abhängigkeit der Konzentration an Ferroionen vom Sauerstoffpartialdruck (Redoxpotential) und vom pH-Wert des Milieus: um so niedriger der pH-Wert, desto größer die Aktivität der Ferroionen. Dazu ist jedoch folgende Einschränkung zu machen. Durch die Versauerung des Milieus (eine Zunahme der Protonaktivität) steigt zwar die lösliche Menge an Eisen(II)-Ionen, sie kann aber nicht ihre Entstehung erklären. Diese ist vielmehr bedingt durch den Sauerstoffpartialdruck, einen Parameter der Elektronenaktivität. Denn bei konstanter pH bedeutet die Abnahme dieses Parameters eine Zunahme der Reduktionstendenz als Folge fortschreitender Reduktionsvorgänge im Boden. Daraus kann nun die Schlußfolgerung gezogen werden, daß der pH-Wert zwar das Ausmaß der Eisenreduktion beeinflussen, jedoch nicht verursachen kann. Nicht die Entstehung, sondern die Verfügbarkeit der löslichen Fe^{2+} -Verbindungen (und Mn^{2+} -Ionen) ist pH-abhängig. Die Befunde von SNIDER (1943) bestätigen diese Formulierung insofern, als er mit zunehmender Versauerung des Bodens eine steigende Konzentration an Fe^{2+} - und Mn^{2+} -Ionen in der Bodenlösung feststellen konnte.

2.4. Eisenreduktion und Sauerstoffspannung

Die beobachtete Abnahme des Redoxpotentials nach einer Wassersättigung des Bodens, bedeutet im Prinzip eine Verringerung des Partialdruckes vom oxydativen Agens Sauerstoff. Auf die Bedeutung dieses Vorganges in mikrobieller Hinsicht wiesen schon STARKEY (1945) und BÉTRÉMIEUX (1951) hin. Ist der Sauerstoff im Boden verbraucht, dann werden die Mikroorganismen unter den nunmehr anaeroben Bedingungen den Sauerstoff der Eisenoxide "konsumieren", so folgerten die Autoren. Die gleiche Vorstellung hatte auch LEEPER (1947) im Hinblick auf die Reduktion von Mangandioxid. BROMFIELD (1954a) gelang es, diese Hypothese auf experimentellem Wege zu widerlegen. Er wies nach, daß Wachstum und Eisenreduktion durch Bacillus polymyxa unter anaeroben Bedingungen nur stattfand in einem Medium, das Glycerin, Nitrat und Eisenoxid enthielt, nicht aber, wenn Nitrat durch Ammonium ersetzt wurde. Er kam zu dem Schluß, daß B. polymyxa

war den Sauerstoff des Nitrat-Ions, aber nicht des Eisenoxids für den respiratorischen Stoffwechsel gebrauchen kann. Er stellte dieser These die Antithese gegenüber, in der er die Eisenreduktion mit der Dehydrogenaseaktivität von B. polymyxa assoziierte (BROMFIELD, 1954b). Wäre diese Vorstellung richtig, dann müßte die Mehrzahl der Mikroorganismen zur Eisenreduktion befähigt sein. Die Verbreitung der eisenreduzierenden Fähigkeit scheint jedoch unter den Mikroorganismen beschränkt zu sein. STARKEY und HALVORSON (1927) berichten erstmalig vom Vorkommen von Escherichia coli und vermutlich Clostridium sporogenes in Bodenproben, die bei Wassersättigung nach Bebrütung eine Eisenreduktion aufwiesen. Unter den 250 Mikroorganismen (darunter Bakterien, Hefen und Actinomyceten) die ROBERTS (1947) aus dem Boden isolierte, konnten nur Stämme von Bacillus polymyxa eindeutig als eisenreduzierend nachgewiesen werden. BROMFIELD (1954a) untersuchte ein Gleyprofil, konnte jedoch keinen einzigen eisenreduzierenden Organismus aus einer Tiefe von etwa 90 cm (G_r -Horizont) isolieren. Dagegen fand er im Oberboden die eisenreduzierenden Bakterien Aerobacter aerogenes, Citrobacter freundii, Bacillus megaterium und Bacillus circulans.

III. KAPITEL

Material und Methoden

3.1. Die Charakterisierung der vergleyten bzw. pseudovergleyten Versuchsböden

1. Placierung der Leitprofile

Am 9.5.1967 wurden die zu untersuchenden Profile freigelegt: ein Gley, ein Pseudogley sowie eine von Hangnässen leicht beeinflusste Braunerde, klassifiziert als eine Pseudogley-Braunerde. Die allochtonen Böden befanden sich alle in einer von Grundwasser und Staunässe beeinflussten Mulde bei Daubringen, weit von Giessen. Die ausgewählten Bodentypen bildeten eine Catena, welche sich in dem leicht ansteigenden Nordhang der Senke zwischen Lollarkopf und Hangelstein befand. Der Gley lag in der Mitte, der Pseudogley im unteren und die Pseudogley-Braunerde im oberen Abschnitt des Unterhanges. Die Profile unterlagen

etwa den gleichen klimatischen, lithogenen und phytogenen Faktoren.

2. Das Ausgangsmaterial

Das Material dieser Schuttböden ist aus tertiären Feinsanden und Lehmen aufgebaut, die später mit einer leichten alluvialen Decke beschichtet worden sind. Ursprung dieses Materials sind im wesentlichen die denudierten subvulkanisch entstandenen Basaltkörper im Osten und Süden des Tales, die hauptsächlich aus feldspatfreien, limburgitischen Basalten und Basalttuffen zusammengesetzt sind (WEYL, 1967). Die Bodenart ist als sandiger Lehm bis lehmiger Sand zu klassifizieren. Die Profilwand der Gruben wurde nach Farbe und Gestalt in Horizonte untergliedert und die Proben aus den Zentren der Schichten entnommen. Das Versuchsmaterial wurde bei 4⁰ C im Kühlraum bis zur Verarbeitung aufbewahrt.

3. Kennzeichnung der Profile

Pseudogley-Braunerde

Vegetation: permanente Wiese mit Gräsern und Kräutern; Knaulgras (Dactylis sp.), Gemeines Straußgras (Agrostis tenuis), Hahnenfußgewächse (Ranunculus sp.), Löwenzahn (Taraxacum officinale), Wiesen-Schaumkraut (Cardamine pratense) und Weißklee (Trifolium repens).

Profilaufbau:

A _h	0-17 cm	brauner, humoser sandiger Lehm; Bröckelgefüge, stark porös und durchwurzelt; Wurmröhren vorhanden;
B _v A _l	17-32 cm	ockerbrauner, sandiger Lehm; schwache Aufhellung; Bröckelgefüge, porös und durchwurzelt;
S _w B _v	32-70 cm	braungrauer lehmiger Sand; fahlgraue und rostgelbe Flecken; Polyedergefüge; einige Konkretionen; feucht und dicht;
S _w	70-100 cm ⁺	fahlgrau, oben noch einige rostgelbe Flecken; sandig; Konkretionen vorhanden; Einzelkorngefüge; dicht und wasserstauend;

Pseudogley

Vegetation: Wiese, zeitweise beweidet; viel Hahnenfuß (Ranunculus

sp.), Wiesen-Schaumkraut (Cardamine pratense),
einige Binsen (Juncus sp.).

Profilaufbau:

A _h 1	0-7	cm	braunschwarzer, rohhumusartiger Moder; stark durchwurzelt, Wurzelfilz; Wurmgänge; feucht;
A _h 2	7-15	cm	schmutziggrauer, humoser Wurzelfilz; anmorig; faserig und reduziert; Molkenschicht;
A _h 3	15-20	cm	braungrauer, humushaltiger, sandiger Lehm; einige Wurzeln noch vorhanden; keine Reduktion;
S _w 1	20-40	cm	graubrauner, sandiger Lehm; rostgelbe Flecken mit zunehmender Intensität in der Tiefe; einige Konkretionen; feucht; übergehend in S _w 2;
S _w 2	40-70	cm	marmorierter, rostgelb bis rostrot gefleckter sandiger Lehm; Streifenbildung an Wurzelröhren; braunschwarze Konkretionen; prismatische Struktur; zunehmend feucht, dicht und klebrig;
S _d	70-120	cm ⁺	grauer Lehm wie S _w 2, keine Marmorierung; leicht reduziert; klebriger, zementierter sandiger Lehm; Konkretionen vereinzelt; wasserführend.

Gley

Vegetation: feuchte Wiese mit Binsengewächsen (Juncus sp.), Seggen (Carex sp.), Dotterblumen (Caltha palustris), Glatthafer (Arrhenaterum sp.), sowie vereinzelt Weiden-Spierstrauch (Spiraea sp.). Auch das kalkliebende Knabenkraut (Orchis purpurea) war vorhanden.

Profilaufbau:

A _h 1	0-10	cm	dunkelgrauer bis schwarzbrauner, humoser Moder; faserige Pflanzenreste; stark durchwurzelt; Wurmröhren; leicht grau reduziert durch ständige Nässe;
A _h 2	10-18	cm	braungrauer, humoser Lehm; stark bewurzelt; Wurmgänge; Wurzelröhren zum Teil braun umhüllt;
A _h G _o	18-30	cm	braun mit rostbraunen Flecken; viele rundliche Konkretionen, meist schwarzbraun; Brockel- bis Prismengefüge, Marmorierung zunehmend in G _o ;
G _o	30-90	cm	typische Marmorierung; klebriger Lehm; nach unten schwach prismatisch mit Roststreifen und schwarzbraunen Konkretionen; plastisch; Übergang zum Reduktionshorizont deutlich;
G _r	90-120	cm ⁺	türkisblaue bis blaugraue Reduktionshorizont; Verfärbung einheitlich; einige dunkle Konkretionen; kohärente, plastische Masse; wassergesättigt.

4. Methoden der chemisch-physikalischen Bodenuntersuchungen

4.1. Bestimmung des pH-Wertes: Die Reaktion der einzelnen Horizonte wurde elektrometrisch (Radiometer pH-Meßgerät) mit einer Glaselektrode und einer gesättigten Kalomelektrode als Bezugshalbzelle in einer Bodenaufschlämmung (1 : 2.5) frischer Bodenproben nach 30 Minuten gemessen. Neben dem $\text{pH}(\text{H}_2\text{O})$ wurde 1 n KCl und 0.01 n CaCl_2 zur Aufschwämmung der Bodenproben benutzt. Die Messung in einer verdünnten CaCl_2 -Lösung hat im Gegensatz zur KCl-Lösung den Vorteil, daß nur ein geringer Umtausch von Metall-Ionen stattfindet.

4.2. Der Carbonatgehalt: Gas-volumetrische Bestimmung des entwickelten Kohlendioxids unter Berücksichtigung des Temperatur- und Druckeinflusses nach Scheibler (SCHLICHTING und BLUME 1966).

4.3. Gesamtorganische Substanz:

- a. Bestimmung als Glühverlust nach 1 1/2 Stunden im Muffelofen bei 800°C .
- b. Errechnet nach der Formel: organische Substanz = C-Gehalt $\times$ 1.724.

4.4. Colorimetrische Bestimmung des Kohlenstoffgehaltes durch nasse Veraschung mit Kaliumbichromat ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) nach RIEHM und ULRICH (1954).

4.5. Der Gesamtstickstoffgehalt (Methode Kjeldahl) wurde nach der Vorschrift von NEHRING (1960) analysiert.

4.6. Nitratbestimmung: Aliquote Menge frischer Bodenproben wurde zur Extraktion des Nitrats mit KAlSO_4 geschüttelt (BALKS und REEKERS, 1955), zum Absetzen stehen gelassen und filtriert. Im klaren Filtrat wurde Nitrat colorimetrisch bestimmt mit Natriumsalicylat (SCHLICHTING und BLUME, 1966).

4.7. Ammoniakbestimmung: nach BREMNER (1965) durch Destillation mit MgO bestimmt.

4.8. Kennzeichnung der pedogenen Eisenoxide

Als "Eisenoxide" werden hier vereinfacht alle Verbindungen im System $\text{Fe}_2\text{O}_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ bezeichnet.

- a. Bestimmung der Gesamtmenge an freien Eisenoxiden: Dithionitlösliches

Eisen, Fe_d (Extraktion nach AGUILERA und JACKSON, 1953).

b. Bestimmung der amorphen Eisenoxide: ammoniumoxalatlösliches Eisen, Fe_o (Extraktion nach TAMM, modifiziert von SCHWERTMANN, 1959).

Die Fe-Bestimmung in den Dithionit- und Oxalatextrakten wurde einheitlich durchgeführt. Aliquote Teile (1-5.0 ml) der Extrakte wurden nach der colorimetrischen Orthophenantrolin-Methode von JACKSON (1958) quantitativ auf den Eisengehalt untersucht.

c. Bestimmung der Eisen(II)-Konzentration, Fe_r : 1-5 g frischer Boden wurden sofort nach der Probeentnahme mit AlCl_3 -Lösung bei pH 3.3 extrahiert (IGNA-TIEFF, 1941). Ein aliquoter Teil (0.5-1.0 ml) des zentrifugierten Extraktes wurden weiter mit 5 ml eines Essigsäure/NaOH-Puffers versetzt, welcher 0.2 % α , α^2 Dipyridylreagenz enthält. Die Extinktion des roten Komplexes wurde bei 546 m μ im Eppendorf-Photometer gemessen und die Eisen(II)-Konzentration (mg Fe^{2+} /l) einer Eichkurve entnommen (JACKSON, 1958).

5. Methoden der mikrobiologischen Populationsanalytik

A. Quantitative Methoden

5.1. Das Gußplattenverfahren nach Koch

Als indirekte Methode ist die Plattentechnik der einzige Weg zu einer gleichzeitig quantitativen und qualitativen Erfassung der Mikroflora des Bodens. Die Nachteile dieses Verfahrens bei der quantitativen Ermittlung der Bakterien (vgl. SINGH-VERMA, 1964) und Pilze (vgl. WARCUP, 1960) sind hinreichend diskutiert worden. Da die Profiluntersuchungen an den hydromorphen Böden sowohl quantitativer als auch qualitativer Art sein mußten, wurde mittels zwei verschiedenen Nährböden das Gußplattenverfahren angewandt. Von jeder Probe wurde eine dezimale Verdünnungsreihe hergestellt und aus den Verdünnungen 10^{-4} - 10^{-6} jeweils 4 Parallelen angelegt. Die Durchführung von mehr als 4 Wiederholungen pro Verdünnungsstufe ist nicht erforderlich, da nach Untersuchungen von STEFANIC (1965) weitere Parallelen die Standardabweichung des arithmetrischen Mittelwertes nicht mehr herabsetzen können. Zur quantitativen Auswertung der Gesamtflora wurden Keimzahlen zwischen 5 und 50 pro Platte benutzt. Zur qualitativen Isolierung von eisenreduzierenden Bakterien wurden jeweils 25 möglichst verschiedene

Bakterien der Platten 10^{-5} und 10^{-6} beider Medien abgeimpft. Die Platten entstammten den Horizonten S_w (Pseudogley-Braunerde), S_d (Pseudogley) und G_r (Gley).

a. Medien zur Ermittlung der Gesamtflora der Bakterien

Jeweils 20 g frischer Boden werden mit 180 ml 0.18 % Natriumpyrophosphat eine Stunde durch Rotation (50 U/Min) geschüttelt und darauf dezimal verdünnt (10^{-1} - 10^{-8}). Folgende Nährböden wurden mit 1 ml Suspension / Platte beimpft:

1. Bodenextrakt-Glucose Agar nach SINGH-VERMA (1964)
2. Glycerin-Pepton Agar nach HIRTE (1961).

Um die Zählung der Kolonien zu erleichtern und die Genauigkeit zu erhöhen, wurde den beiden Medien 0.001 % TTC-Lösung(2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid) zugesetzt. TTC läßt sogar die kleinsten Kolonien im Agar rot erscheinen (UNGER, 1958) und ist unschädlich für Bakterien bis zu einer Konzentration von 0.05 % (WEINBERG, 1953). Zur Erfassung der Bodenbakterien mit komplexen Ernährungsansprüchen wurden beide Medien weiter mit 0.05 % Hefe-Extrakt (Difco) verstärkt, weil ein bedeutender Anteil der Bodenbakterien zum Wachstum gewisse Vitamine benötigen (LOCHHEAD und THEXTON, 1952). Inkubation: 7 Tage bei 25°C .

Herstellung des Bodenextraktes: siehe S. 31

b. Selektivnährböden zur

1. Bestimmung des Azotobacter-Vorkommens auf N-freiem Mannitagar (GLATHE und AHRENS, 1963):
2. Bestimmung der Oxalat-abbauenden Bakterien (WAGNER, 1966)
3. Bestimmung heterotropher Eisen(III)-Chelate abbauender Bakterien (HARDER, 1919)

5.2. Die Methode der Grenzverdünnung zur Ermittlung der MPN

Dieses Verdünnungsverfahren dient der quantitativen Bestimmung der zu einer bestimmten physiologischen Gruppe gehörenden Bakterienpopulation. Mit diesem Verfahren wird nicht die tatsächliche Populationsdichte, sondern nur ihr wahr-

scheinlicher Grenzwert, die Most Probable Number ermittelt (vgl. COCHRAN, 1950).

Methodik: Aus einer üblichen, dezimalen Verdünnungsreihe (10^{-1} - 10^{-8}) wurden jeweils 3 Röhrchen mit einer Selektivnährlösung angesetzt, die je 1 ml Einsaat erhielten. Nach der vorgeschriebenen Bebrütungsdauer, wurde die wahrscheinlichste Keimzahl (MPN/ml) einer physiologischen Gruppe nach den Chiffren von McCRADY (siehe Tabelle POCHON und TARDIEUX, 1962) und der Methode von HOSKINS (1934) ermittelt, und die MPN per g ofentrockener Boden errechnet. Die Vertrauensgrenze des MPN-Ergebnisses, mit einer Wahrscheinlichkeitsstufe von $P = 0.95$, wurde für die Verdünnungsstufe 10 und 3 Röhrchen je Stufe nach oben und unten gesichert (COCHRAN, 1950).

Mikrobiologie des Eisenkreislaufes im Boden

1. MPN der eisen-immobilisierenden Bakterien

Bakterien, welche lösliche Eisen(III)-Komplexe mineralisieren können, werden in der Nährlösung nach HARDER (1919), in der Variation mit $0.2 \text{ g CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ / 1 nach DOMMERGUES und DUCHAUFOUR (1965) bestimmt. Nach einer Bebrütung von 7 Tagen (30°C) zeigten die positiven Röhrchen an der Oberfläche der Flüssigkeit ein rotes Häutchen und /oder einen roten Bodensatz aus Eisenoxid.

2. MPN der eisen-reduzierenden Bakterien (OTTOW, 1968)

Zur quantitativen Erfassung solcher Bakterien, die potentiell zur Reduktion von Eisen(III)-Oxiden befähigt sind, wurde ein geeignetes Nährsubstrat entwickelt. Bei der Zusammensetzung wurde von ROBERTS (1947) Medium ausgegangen und unter Berücksichtigung der folgenden Anforderungen angepaßt. Das Milieu sollte

1. reproduzierbar und deshalb weitgehend synthetischer Natur sein;
2. optimale Bedingungen zur Entwicklung eines möglichst breiten Organismenspektrums liefern, um die noch unbekannten eisen-reduzierenden Bakterien erfassen zu können. Als N-Quelle wurde die Aminodicarbonsäure Asparagin gewählt, eine von allen Mikroorganismen zur Eiweissynthese verwertbare Aminosäure. Als C-Quelle wurde D (+)-Glucose beibehalten. Nach LOCHHEAD und THEXTON (1947) brauchen etwa 7 % der Bodenbakterien zur Entwicklung Bodenextrakt, dagegen benötigen mindestens 16 % dieser Organismen Hefeextrakt. Es wurde daher auf den Zusatz von Bodenextrakt verzichtet, ~~zumal~~ (1) seine Zusammen-

setzung bodenbedingt ist und (2) die wachstumsfördernde Wirkung vor allem auf den Gehalt an Spurenelementen und weniger auf biologische Wirkstoffe zurückzuführen ist (SPICHER, 1955).

3. eine geringe Menge oxidierte Verbindungen enthalten, die außer $\text{Fe}_2\text{O}_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ als Sauerstoffquelle oder Elektronenakzeptor dienen können.

Nach einer Reihe von Vorversuchen (OTTOW, 1966) und theoretischen Erwägungen wurde eine gepufferte Glucose-Asparagin Nährlösung folgender Zusammensetzung gewählt:

K_2HPO_4	3.0 g
KH_2PO_4	0.8 g
KCl	0.2 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.2 g
Asparagin	5.0 g
Glucose	20.0 g
Hefeextrakt (Difco)	0.5 g
Fe_2O_3 (Hämatitpulver)	1.0 g
Leitungswasser	1000 ml

pH = 7.0 (die Reaktion wurde mit 2 n Natriumcarbonat eingestellt).

Beim Ansetzen der Nährlösung wurden die Ingredients in der aufgeführten Reihenfolge im fertigen Phosphatpuffer gelöst und unter Rühren (Magnetrührer) in 7 ml Portionen über die 16 mm Röhrchen verteilt. Sterilisiert wurde im Autoklaven (1 Minute bei 1 atü Überdruck).

Methodik des Nachweises der Eisenreduktion:

Die wie üblich beimpften Röhrchen (10^{-1} - 10^{-8} ; 3 Parallelen je Stufe) enthielten nach einer Bebrütung von 5 Tagen (25°C) 1 ml einer 0.2 %igen α, α' -Dipyridyl-lösung, gepuffert in 10 %iger Essigsäure. α, α' -Dipyridyl (= 2,2'-Bipyridin) ist ein für Eisen(II)-Ionen spezifisches Reagenz, das nur mit diesen Ionen ein rot gefärbtes Komplex bildet. Röhrchen, die nach Zugabe dieses Reagenz eine gleichmäßige oder nur im unteren Abschnitt eine Rotfärbung aufwiesen, wurden als positiv bewertet.

Differenzierung der eisenreduzierenden Population:

a. Die Coli-Aerobacter Gruppe (Enterobacteriaceae): Die Selektivität des Medium für diese Organismengruppe wurde erreicht durch den Ersatz von Glucose durch Lactose im Glucose-Asparagin Nährmedium.

b. Die aeroben und fakultativ anaeroben Sporenbildner (Bacillaceae): Pasteurisation (15 Min bei 81°C) der dezimalen Verdünnungsstufen vor der Einsaat. Nachweis der Eisenreduktion wie oben. Bestimmung der Säure- bzw. Gasbildung durch Zusatz von 1 ml 1,6 % Bromthymolblau-Lösung/1 und Durhamröhrchen pro Reagenzglas.

3. MPN der anaeroben, eisenreduzierenden und stickstoffbindenden Clostridien

Zum Nachweis eisenreduzierender Clostridien wurde dem N-freien Nährmedium von AUGIER (1957) 0.1 % Hämatin in Pulverform zugesetzt. Die Auswertung erfolgte nach zehntägiger Bebrütung bei 30°C . Das Vorkommen von N_2 -bindenden Clostridien ist erkennbar an Gasbildung in den Durhamröhrchen; die Eisenreduktion an der Rotfärbung nach Zugabe von 1 ml α, α' -Dipyridylreagenz.

4. MPN der sulfatreduzierenden Bakterien (POSTGATE, 1963)

5. MPN der fakultativ anaeroben Bakterien, die organische Schwefelverbindungen mineralisieren (de BARJAC und POCHON, 1955)

Am Abbau schwefelhaltiger organischer Verbindungen sind zahlreiche Bakterien beteiligt. Dabei entstehen Merkaptane oder Schwefelwasserstoff als Zwischen- bzw. Endprodukte. Die quantitative Bestimmung dieser Population wurde an der Mineralisierung von Methionin durchgeführt. Zum Nachweis der Eisenreduktion während dieses Prozesses wurde dem Nährmedium außerdem 0.1 % Fe_2O_3 zugesetzt. Die Bildung eines schwarzen Niederschlags (FeS) nach 3-wöchiger Bebrütung (30°C), sowie die Bildung eines roten Komplexes mit α, α' -Dipyridylreagenz wurde als eine positive Reaktion auf H_2S bzw. Eisen(II)-Ionen interpretiert.

6. Die Bestimmung der potentiellen Zellulosezersetzungsaktivität (MPN/g Boden) erfolgte quantitativ nach dreiwöchiger Inkubation (30°C) von Filtrierpapierstreifen in der Nährlösung von POCHON und TARDIEUX (1962).

Auswertung: Zerreißen des Filterpapiers nach schütteln mit der Hand; auch Gelb- und Braunfärbung der Streifen wurde positiv bewertet.

7. MPN der Säurebildner bzw. Gasbildner in BTB-Glucose-Asparagin Nährlösung
Pro Liter der üblichen 2 %igen Glucose-Asparagin Nährlösung wurde als Indikator 1 ml 1,6 % Bromthymolblau-Lösung zugesetzt. 8 ml Portionen je Reagenzglas; 3 Parallelen/Verdünnungsstufe (10^{-1} - 10^{-8}). Gelbfärbung nach 5 Tagen (25° C) zeigte Säurebildung an, Gasbildung in Durhamröhrchen wurde zum Nachweis der Gasbildner verwendet.

8. MPN der dissimilatorischen nitratreduzierenden Bakterien

Als Nährlösung wurde ebenfalls die Glucose-Asparagin Zusammensetzung mit Zusatz von 0.1 % KNO_3 verwendet. Beimpft wurden 3 Röhrchen je Verdünnung. Nach 48 Stunden wurde das Vorkommen auf Nitrit (Tüpfeltest mit Reagenz nach GRIESS) geprüft. Bestimmung wurde nach 3 und 5 Tagen wiederholt. Da Asparagin als N-Quelle von den Bakterien bevorzugt wird, kann die Nitratreduktion (z.T. Denitrifikation) als dissimilatorischer Vorgang betrachtet werden (NASON, 1962).

5.3. Ermittlung der Aktivitätskurven der dissimilatorischen Nitratreduktion, Nitritbildung, Gasbildung, Säurereproduktion und Eisenreduktion

Die Entwicklung dieser Vorgänge wurde verfolgt in Anlehnung an das Verfahren von POCHON und TARDIEUX (1962). Die übliche 2 %ige Glucose-Asparagin Nährlösung enthielt dazu 0.1 % Fe_2O_3 , 0.1 % KNO_3 und 1 ml 1.6 % BTB-Lösung je l. Bebrütung erfolgte bei 30° C. Nach 1, 2, 3, 4, 5, 7, 9, 12 und 15 Tagen wurde jedes Röhrchen (3 Röhrchen je Verdünnungsstufe 10^{-1} - 10^{-8}) unter Einhaltung steriler Bedingungen mittels Tüpfeltest auf die Anwesenheit von

Nitrat (mit schwefelsaurem Diphenylamin)

Nitrit (mit Reagenz von Griess I und II)

Ammoniak (Nessler's Reagenz)

Eisen(II)-Ionen (3 Tropfen 0.2 % α, α' -Dipyridylreagenz)

Gas (Durham-Röhrchen)

untersucht und die Ergebnisse tabelliert. Die Untersuchungen wurden an Proben der S_w (Pseudogley-Braunerde), S_d (Pseudogley) und G_r (Gley) durchgeführt. Zu jedem tabellierten Tag errechnet man den D_m -Quotienten (mittlerer Grenzverdün-

nungsindex) wie folgt:

$$D_m = \frac{\text{Gesamtzahl der positiven Röhrchen je Tag}}{\text{Zahl der beimpften Röhrchen je Stufe}}$$

Auf diese Weise ist es möglich die Entwicklung eines spezifischen physiologischen Vorganges in einem komplexen Medium in Abhängigkeit von der Zeit zu verfolgen. Der Entwicklungsverlauf wird bedingt durch die Dichte und physiologische Aktivität der Population im Inokulum jeder Verdünnungsstufe. Die Ergebnisse wurden graphisch dargestellt.

5.4. Nährböden zur quantitativen Ermittlung der Zahl an Pilz-, Actinomyceten- und Algen-Einheiten

1. Nährboden für Pilze: Malzagar (MÜLLER, 1965)

2. Nährboden für Actinomyceten

- a. Glycerin-Glykokollagar (von PLOTHO, 1940).
- b. Waksman's Glucose-Asparagin Agar (MÜLLER, 1965).
- c. Hafer-Agar, zubereitet nach AHRENS (1967).

3. Nährboden für Pilze und Actinomyceten (OTTOW und GLATHE, 1968)

Zur gleichzeitigen Erfassung von Pilzen und Actinomyceten wurde folgendes Medium verwendet: Malzextrakt, 20.0 g; K_2HPO_4 , 0.5 g; Bengalrosa, 1:15 000; Spurenelemente Fe, Mn, Zn, Co, B und Mo in Konzentrationen von 1 mg/l (als lösliche Salze, jedoch nicht als Nitrate); Leitungswasser, 1000 ml; Agar, 20 g. pH = 6.0-6.2. Die Platten wurden im Dunkeln bebrütet, da das Bengalrosa durch den Einfluß von Tageslicht hemmend wirkt auf die Entwicklung von Pilzen (KUCHNER und MITROVICH, 1967). Die Pilze wurden nach 5-7 Tagen, die Actinomyceten dagegen nach 10-14 Tagen gezählt. Letztere erscheinen im Medium als intensiv rosarote, oder gelegentlich orangenrosa gefärbte, runde Kolonien.

4. MPN der Bodenalgen (Cyanophyceen und Chlorophyceen)

Zur quantitativen Bestimmung der grünen und blaugrünen Algen wurde in Anlehnung an die Vorschrift in den Mitteilungen des Verbandes deutscher landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten Nr. 4/1963 eine Nährlösung

folgender Zusammensetzung benutzt: Aqua dest., 950 ml; Bodenextrakt, 50 ml; Natriumacetat . $3\text{H}_2\text{O}$, 0.5 g; $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$. $4\text{H}_2\text{O}$, 0.5 g; K_2HPO_4 , 0.2 g; MgSO_4 . $7\text{H}_2\text{O}$, 0.1 g; CaCl_2 . $6\text{H}_2\text{O}$, 0.1 g; Hefeextrakt 0.05 g; FeSO_4 . $7\text{H}_2\text{O}$, 0.05 g; MnSO_4 . $4\text{H}_2\text{O}$, 0.01 g; Na_2MoO_4 , 0.005 g; Agar, 10 g. pH = 6.5.

Die Nährlösung wurde auf 80°C erhitzt, in Röhrchen abgefüllt und 1 Min autoklaviert. Beimpft wurden 3 Röhrchen je Verdünnungsstufe 10^{-1} - 10^{-8} . Nach einer Inkubation von 4 bis 6 Wochen bei Tageslicht, wurde Algenwuchs an den Agarklumpchen durch Grünfärbung erkannt, und die positiven Röhrchen nach den Chiffren von McCRADY ausgewertet. Die Ergebnisse sind mit Vorsicht zu betrachten, da manche Bodenalgenarten nicht nur einzellig, sondern auch als Filamente auftreten können. Besser wäre es auch hier von "Einheiten" zu sprechen.

5.5. Standardagar und Zubereitung des Bodenextraktes

Nähragar:

Pepton	5.0 g
Liebigs Fleischextrakt	3.0 g
Hefeextrakt	1.0 g
Leitungswasser	1000 ml
Agar Agar	18 g

pH = 7.0

Zubereitung des Bodenextraktes

Der in den verschiedenen Nährböden verwendete Bodenextrakt wurde aus dem humusreichen Material des A-Horizontes der untersuchten Pseudogley-Braunerde hergestellt. Dazu wurden 500 g des lufttrockenen und gesiebten Bodens mit 1 l entsalztem Wasser und etwa 5 g CaCO_3 (zur Ausfällung der Tonteilchen) ungefähr 30 Minuten im Autoklaven extrahiert, gekühlt, dekantiert und filtriert, und am folgenden Tag nochmals 5 Min autoklaviert und im Kühlschrank aufbewahrt.

Bemerkung: Sämtliche aufgeführte Nährmedien wurden frisch zubereitet vor Benutzung. Die Sterilisation erfolgte im Autoklaven bei 121°C .

B. Qualitative Analyse zur Isolierung eisenreduzierender Bakterien

5.6. Isolierung eisenreduzierender Bakterien aus vergleyten Horizonten

Jeweils 25 Kolonien der Platten von den Verdünnungen 10^{-5} und 10^{-6} , welche aus den Horizonten S_w , S_d und G_r der Versuchsböden stammten, wurden abgeimpft und auf Nähragar bis zur Reinheit fraktioniert ausgestrichen. Die Bakterien entstammten sowohl dem Glycerin-Pepton- als auch dem Bodenextrakt-Glucoseagar. Die einzelnen Organismen wurden nach morphologischer Prüfung auf Reinheit auf Schrägagar geimpft und bei 4°C im Kühlraum zur weiteren biochemischen Differenzierung aufbewahrt. Sämtliche Isolierungen wurden zunächst qualitativ auf ihre eisenreduzierende Fähigkeit geprüft und die positiven Stämme nach ihrer taxonomischen Zugehörigkeit differenziert.

5.7. Morphologische und biochemische Differenzierung der isolierten Stämme

Die eisenreduzierenden Stämme (insgesamt 71) wurden erneut auf Nähragar ausgestrichen, Präparate angefertigt, gefärbt und mikroskopisch auf Reinheit untersucht. Wenn erforderlich wurde das fraktionierte Ausstreichen bis zur Reinkultur wiederholt. Zur systematischen Diagnostik wurde das Verhalten der Bakterienstämme aufgrund ihrer Enzymsysteme auf den verschiedensten Differentialnährmedien geprüft. Allgemeine methodische Anleitungen lieferten LORD (1959), sowie HENDRIE und SHEWAN (1966) zur Bestimmung von Pseudomonaden, WOLF und BARKER (1968) für die Differenzierung der Bazillen, und HENDRIE, MITCHELL und SHEWAN (1968) bei der Klassifizierung von Gram-negativen, gelb pigmentierten Stäbchen. Für die Zusammensetzung, Zubereitung und Lektüre der Testmethoden sei auf die dort zitierte Literatur verwiesen, soweit keine Modifikationen vorgenommen wurden. Anhand der gesammelten Daten erfolgte die Bestimmung der Organismen mit Hilfe von BERGEY's Manual of Determinative Bacteriology (1957). Der bei der Diagnostik angewandte Schlüssel ist hier kurz zusammengefaßt.

- I. Klassifizierung nach Morphologie: Gramfärbung; Endosporenfärbung nach Klein (MÜLLER und MELCHINGER, 1964). Die mikroskopischen Untersuchungen wurden an 48 Std. alten Plattenkulturen (Nähragar, Kultivierung bei 25°C)

vorgenommen.

II. Feststellung der oxidativen und fermentativen Nutzung wichtiger Kohlenstoffquellen

- Wachstum auf LORD's C-freiem und HEINEMANN's N-freiem Nährmedium;
- Nachweis der Fähigkeit zur Nutzung von für systematische Zwecke wichtigen Kohlehydraten: Säurebildung und Gasbildung von Glucose und Lactose sowie Verwertung von Zellulose (LORD, 1959);
- Bestimmung des oxidativen bzw. fermentativen Abbaus von Glucose und Lactose zur Gruppendifferenzierung der Gram-negativen Bakterien (O/F-Medium nach HUGH und LEIFSON, 1953):

Gruppendifferenzierung der Gram-negativen Bakterien

Gruppe	O/F Verwertung:	Glucose		Lactose	
		oxid.	ferm.	oxid.	ferm.
I.	<u>Alcaligenes</u> sp.	-	-	-	-
II.	<u>Pseudomonas</u> sp.;	+	-	-	-
	<u>Agrobacterium</u> sp.				
III.	<u>Aerobacter</u> ,				
	<u>Aeromonas</u> ,	+	+	+	+
	<u>Shigella</u> sp.				
IV.	Paracolon Gruppe	+	+	-	- 1)

1) negativ innerhalb von 5 Tagen; positiv nach 5 - 21 Tagen.

Aufgrund der Versuchsergebnisse der Abschnitte I und II wurde die Zugehörigkeit zu der Familie mit Wahrscheinlichkeit eingekreist.

III. Die Bunte Reihe und biochemische Differenzierung

Für die biochemische Untersuchung von Stoffwechselleistungen wurde nachstehende Skala biochemischer Tests durchgeführt. Die engere Wahl der Teste beruhte auf den bereits ermittelten Ergebnissen. Im allgemeinen betrug die Bebrütungstemperatur 30° C, wenn nicht anders angegeben. Zur Herstellung der Differentialmedien wurden Chemikalien von "Merck" oder "Riedel de Haen", Hefeextrakt, Proteose Pepton, Trypton, Tryptose, Lackmusmilch und Aminosäuren aus Milcheiweiß (= Casaminoacids) von der Firma "Difco", Pepton "Merck" und Liebig's Fleischextrakt von der "Compagnie Liebig-Antwerpen" verwendet.

Die biochemische Untersuchung der Stoffwechselleistungen

Bunte Reihe: Zur Feststellung der verwertbaren Kohlenhydrate wurde die von LORD (1959) angegebene Nährlösung benutzt, wozu jeweils das Testsubstrat in 0.5 %iger Konzentration gegeben wurde. Auf Gas- und Säurebildung wurden geprüft die C-Quellen: Arabinose, Galactose, Inosit, Maltose, Mannit, Rhamnose und Sucrose.

Biochemische Leistungen: Wenn nicht anders spezifiziert, wurden die Nährböden und Methoden nach den Angaben von LORD (1959) hergestellt bzw. durchgeführt. Folgende Leistungen wurden untersucht: Schwefelwasserstoffbildung (Pepton-Eisen-agar und Eisen-Drei-Zucker Agar, sog. TSI Agar); Acetylmethylcarbinol- und Säurebildung in Methylrot-Voges-Proskauer Bouillon (MR-VP Medium); Indolbildung (Tryptonwasser); Motilitätsnachweis (in semifestem Tryptose-Stichagar); kombinierte Indol- und Motilitätsprüfung (im semifestem Trypton-TTC-Stichagar nach BLAZEVIC, 1968); Katalase; Oxidase (KOVACS, 1956); Gelatinase (auf Nährgelatine mit Frazier's Entwickler sowie auf Verflüssigung von 15 %iger Gelatin-agar); Stärkehydrolyse; aerobe, neutrale bzw. anaerobe, alkalische Nitratreduktion und Denitrifikation; Prüfung auf Säurebildung, Alkalisierung, Gasbildung und Gerinnung von Milcheiweiß in Lackmusmilch; Beurteilung des Wachstums auf Nähragar bei 25°, 30°, 37° und 42° C.

Nachweis der Pigmentbildung bei Pseudomonaden:

1. Fluoreszierende, wasserlösliche Pigmente: Ergrünung der Nährlösung nach ELLIOT (1958),
2. Pyocyaninbildung (Blau- bis Blaugrünfärbung) bzw. Pyorubinbildung (Rosa- bis Rotbraunverfärbung) von King's Medium A (KING et al., 1954).
3. Nachweis von grüngelben bis hellgrünen Fluorescinen in King's Medium B (KING et al., 1954).

Spezialmedien zur Differenzierung von Bazillen (WOLF und BARKER, 1968):

Feststellung des Vitaminbedarfs (NH₄-Glucose Nährlösung); Wachstumshemmung von Glucose (Glucose-Schrägagar); Prüfung der Salzempfindlichkeit (10 % NaCl-Bouillon); Lecithinase-Nachweis (Eigelbagar).

- 3.2. Einfluß eisenreduzierender Bakterien auf Eh, pH, Eisenreduktion und Verglebung in künstlich überfluteten Böden ⁺⁾

Versuchszweck: Um den natürlichen Verhältnissen der Vorgänge der Eisenreduktion näher zu kommen, wurde der Einfluß eisenreduzierender Bakterien auf das Redoxpotential (Eh), pH und Ausmaß der Transformation der Eisenoxide in einem künstlich überfluteten Boden im Labor untersucht. Darüber hinaus sollte nachgewiesen werden, ob dabei Verglebenserscheinungen feststellbar sind.

Versuchsanstellung: Weithals-Erlenmeyerkolben (250 ml) wurden mit einer 1.5 cm Schicht eines gesiebten (< 0.2 mm) Bodens gefüllt. Als Versuchsobjekt diente ein roter, hämatithaltiger (0.34 % Fe₂O₃), illitreicher tropischer Reliktboden, der

⁺⁾ Diese Versuchsserie wurde während des Aufenthaltes in Manhattan, Kansas, U.S.A. (1965-1966) begonnen.

in vielen Gegenden von Kansas, U.S.A. zu Tage tritt (WATERMAN, 1951). In der Bodenschicht wurde eine Elektrode eingelassen, die aus einer Platinspirale (5 cm Länge) bestand, gelötet an einen Kupferdraht. Zur Vermeidung von Polarisationserscheinungen wurde der Draht in einer Glasfassung so eingeschmolzen, daß ein Teil der Spirale miterfaßt wurde, während das Ende frei blieb um als Kontakt zur Meßapparatur dienen zu können. Die Elektrode wurde durch Waschen in 10 %iger Schwefelsäure vorher kathodisch polarisiert und permanent im Versuchsboden belassen. Darauf wurde der Boden mit einer 2 %igen Sucroslösung gesättigt, die Kolben mit einer Aluminiumfolie verschlossen und 15 Min im Autoklaven sterilisiert. Nach Abkühlen wurden die Kolben mit einer getrennt sterilisierten 2 %igen Sucroslösung bis zum Hals aufgefüllt und beimpft.

Kulturen: Zur Inokulation dienten 4 weitverbreitete, fakultativ anaerobe Bakterien: Bacillus polymyxa, Bacillus circulans, Aerobacter aerogenes und Aerobacter cloacae.

Die Organismen wurden auf Schrägagar gezüchtet und 3 Ösen einer 24-48 stündigen Kultur übergeimpft. Eine weitere Versuchsserie (Duplo-Ansätze) wurde mit einem heterogenen Bodeninokulum infiziert. Zur Herstellung dieses Inokulum wurden 5 g Gartenerde mit 200 ml einer 0.5 %igen Sucrolösung versetzt und 48 Std. bei 30° C bebrütet. Von dieser Aufschwemmung wurden 3 ml zum Impfen verwendet.

Elektrometrische Messungen: Die Reaktion wurde zwischen einer Glaselektrode und einer gesättigten Kalomelektrode gemessen; das Redoxpotential zwischen der Platinelektrode und der Kalomelhalbzelle. Das gemessene Potential gegenüber einer Wasserstoffelektrode wurde nach der Beziehung von IVES und JANZ (1961) ermittelt:

$$E_h = E_{\text{Kal}} + 0.241 \text{ V } (30^\circ)$$

Die Reduktionsintensität (rH) konnte nach RABOTNOVA (1963) folgenderweise errechnet werden:

$$rH = \frac{E_h}{0.03} + 2 \text{ pH } (30^\circ)$$

Vor und nach jeder Messung wurden die Elektroden sorgfältig gereinigt und in 10 % Phenol und 95 % Äthanol desinfiziert. Zur Reinheitsprüfung wurde jeder

Kolben in regelmäßigen Abständen geprüft durch einen fraktionierten Ausstrich auf Nähragar.

Quantitative Bestimmung der reduzierten Eisen(II)-Ionen: Nach jeder elektrometrischen Messung wurde der Kulturlösung 1 ml unter Einhaltung steriler Bedingungen entnommen und der Konzentration an gelöstem Eisen nach der Orthophenanthrolin-Methode bestimmt (JACKSON, 1958).

3.3. Die Testorganismen

Sämtliche Pilze, Actinomyceten, Hefen und ein Teil der Bakterienkulturen entstammen der Stammsammlung des Instituts für landwirtschaftliche Mikrobiologie. Die Versuchsorganismen wurden auf Schrägagar bei 4⁰ C im Kühlraum aufbewahrt, alle 2 bis 3 Monate fraktioniert ausgestrichen und typische Kolonien erneut abgeimpft. Folgende Bakterienstämme wurden freundlicherweise vom Department of Bacteriology, Kansas State University, Manhattan, U.S.A. zur Verfügung gestellt:

<u>Bacillus cereus</u>	<u>Escherichia coli</u>
B. <u>circulans</u>	<u>Citrobacter freundii</u>
B. <u>megaterium</u>	<u>Micrococcus roseus</u>
B. <u>polymyxa</u>	<u>Pseudomonas aeruginosa</u>
B. <u>subtilis</u>	<u>Serratia marcescens</u>

Nachstehende Kulturen wurden vom Autor während seines Aufenthaltes in Manhattan, Kansas, aus dem Boden isoliert und bestimmt (OTTOW, 1966):

Aerobacter aerogenes; Aerobacter cloacae; Paracolobactrum aerogenoides.

Die in der vorliegenden Arbeit geführten Artbezeichnungen entsprechen bei den Bakterien und Actinomyceten der Nomenklatur in Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (1957). Da die Artbezeichnung Bacillus mesentericus in Bergey's Manual nicht mehr als Species anerkannt wird, jedoch bei KRASSILNIKOV (1959) noch als solche geführt wird, wurde ihre Bezeichnung ausnahmsweise aufgrund der Geläufigkeit hier beibehalten.

Bacillus mesentericus ist nach Ansichten von SMITH, GORDON und CLARK (1952) eine Variante von Bacillus pumilus. Aufgrund genetischer Studien betrachten

WOLF und BARKER (1968) neuerdings Bacillus pumilus als Modifikation der Gruppe Bacillus subtilis. Die Europäische Form von Bacillus mesentericus wurde schon früher als eine intermediäre Form der ovalsporigen pumilus-subtilis Gruppe betrachtet (COLLINS, 1964).

3.4. Methoden zur Bestimmung der mikrobiellen Eisenreduktion

1. Die qualitative Bestimmung der potentiellen Kapazität Eisen zu reduzieren

Der zu prüfende Organismus wurde mit der Öse in ein 16 mm Reagenzglas geimpft, welches 7 ml der sterilen 2 %igen Glucose-Asparagin Nährlösung enthielt. Zum Nachweis der Eisenreduktion war 0.1 % Fe_2O_3 (Hämatit) in Pulverform zugesetzt worden. Nach einer Bebrütung von 5 Tagen (25°C) erfolgte der Nachweis auf Eisen(II)-Ionen mit 1 ml einer 0.2 %igen α, α -Dipyridylreagenzlösung. Eine positive Reaktion zeigte eine Rotfärbung im Medium, die entweder einheitlich war (bei Gasbildnern) oder eine intensive Rotfärbung im unteren Abschnitt des Röhrchens aufwies (bei Nicht-Gasbildnern).

2. Die quantitative Bestimmung der potentiellen Kapazität Eisen zu reduzieren (OTTOW, 1968)

25 ml der oben erwähnten Nährlösung wurden in 100 ml enghalsigen Kolben quantitativ überführt und eine Minute bei 1 atü autoklaviert. Nach Abkühlen wurde das Medium mit 2 Tropfen einer 24-48-stündigen Bakteriensuspension (von Schrägagar-Kulturen) mit der Pipette beimpft und 5 Tage (25°C) im Dunkeln bebrütet. Nach der Inkubation wurde die Kultur vorsichtig umgeschwenkt, 1 ml der überstehenden Flüssigkeit entnommen, und mit 1 ml α, α -Dipyridylreagenz (0.2 g α, α -Dipyridyl + 10 ml Eisessig in 100 ml dest. Wasser gelöst) versetzt, bis zur 15 ml-Marke aufgefüllt, umgeschüttelt und 15 Minuten stehen gelassen. Das rote Farbkomplex wurde anschließend bis zur Klärung zentrifugiert (etwa 15 Min bei 5000 Umdrehungen je Min) und die Extinktion bei $546\text{ m}\mu$ im Eppendorf-Photometer gemessen. Die Eisen(II)-Ionen Konzentration ($\text{mg Fe}^{2+}/\text{l}$) wurde einer Eichkurve entnommen. Zur Herstellung der Standardlösung mit einer Konzentration von 100 ppm Fe wurden 0.7023 g $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ mit 20 ml 0.6 N HCl in 1 l gelöst. Zur Bestimmung der Eisenreduktion unter anaeroben Bedingungen wurden die beimpften Kolben unter N_2 -Atmosphäre in McIntosh-Fildes Gefäßen bebrütet. Als Indikator der Anaerobiose

wurde eine reduzierte Mischung aus 1 ml 0.02 % NaOH, 1 ml 1 % Dextrose und 1 ml 0.015 % Metylenblaulösung benutzt. Direkt vor dem Schließen wurden noch 20 ml 1n NaOH zu etwa 3 g Pyrogallol gegeben und mit eingeschlossen.

Nach jeder quantitativen Bestimmung wurde die Reaktion der Kulturlösung elektrometrisch gemessen.

Methodische Fehler: Die Methode ist sehr selektiv, weil α, α' -Dipyridyl spezifisch für Eisen(II)-Ionen ist.

Bei dieser Methode wird unterstellt, daß die Unterschiede im Inokulum durch die Erfassung der Gesamtaktivität nach 5 Tagen ausgeglichen sind. In Vorversuchen ergab sich kein Unterschied in der eisenreduzierenden Kapazität von Aerobacter aerogenes, Bacillus polymyxa, Bacillus mesentericus und Pseudomonas aeruginosa, wenn die Ansätze entweder mit 1, 2 oder 4 Tropfen Kultursuspension beimpft worden war.

Genauigkeit der Methode: Für die nachfolgenden eisenreduzierenden Bakterien wurde als Maß der Streuung aus einer Stichprobe ($n = 7$) der arithmische Mittelwert und dessen relative Standardabweichung ($Sx\%$) der Extinktionsmessungen ermittelt.

Organismen	m in mg Fe^{2+} /1	$Sx\%$
A. <u>aerogenes</u>	6.0	0.44
B. <u>polymyxa</u>	3.5	0.36
B. <u>mesentericus</u>	8.0	0.41
Ps. <u>aeruginosa</u>	20.0	0.35

3.5. Die Isolierung und Züchtung von Nitrat-Reduktase negativen (nit^-) Mutanten aus eisenreduzierenden Bakterien

1. Prinzipielle Grundlage

Die Toxizität des Chlorat-Ions für Bakterien ist beschränkt auf solche Organismen, die über das Enzym Nitrat-Reduktase A verfügen. Dieses Enzym reduziert außer Nitrat auch Chlorat, wobei sich Chlorverbindungen (u.a. Chlorit) anhäufen, die letal wirken (PUIG et al. 1967). Chlorat-resistente Mutanten (Chl-r) können

aber gewonnen werden durch wiederholte Subkultivierung der Wildstämme in chlorathaltigen Medien, wobei eine Selektion der Nitrat-Reduktase negativen Phenotypen (nit^-) stattfindet. Die meisten dieser Mutanten verlieren außer dem Enzym Nitrat-Reduktase A auch die Aktivität des Enzyms Hydrogenlyase (gas^- ; $\text{HCOOH} = \text{H}_2 + \text{CO}_2$), wenn dieses Enzym im Wildstamm vorhanden war.

2. Methodik

Mit einer Öse wurde ein wenig Bakterienmaterial eines Wildstammes (24-stündige Schrägagarkultur) in 10 ml einer Nährlösung nach STOUTHAMER (1967) eingepflegt, und nach 24-stündiger Bebrütung (30°C) erneut eine Öse der Kulturfälligkeit in 10 ml der gleichen Chloratnährlösung überführt etc. Nach 15 Subkulturen wurde ein fraktionierter Ausstrich auf Nähragar ausgeführt und einige Einzelkolonien auf einen Minimalagar (DAVIS und MINGIOLI, 1950), mit $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ oder KNO_3 als einzige Stickstoffquelle, übergeimpft. Kolonien, die das Ammoniumion verwenden konnten, aber kein Wachstum auf dem nitrathaltigen Medium zeigten, wurden mit einem fraktionierten Ausstrich auf chlorathaltigem (12.5 g $\text{KClO}_3/1$) Minimalagar auf Chloratresistenz geprüft. Fand Wachstum statt, so wurde zur Isolierung von Chl-r Stämmen noch 4 mal fraktioniert auf chlorathaltigem Agar ausgestrichen. Die chloratresistenten Stämme wurden auf Nitritbildung geprüft in einer 0.1 % KNO_3 -Nährlösung folgender Zusammensetzung: KNO_3 , 0.1 %; Pepton, 0.5 %; Fleischextrakt, 0.3 %; pH = 7.0. Nitrat-Reduktase negative (nit^-) Mutanten zeigten im Tüpfeltest keine Rotfärbung mit Griess' Reagenz. Wenn nötig, wurde die Subkultivierung bis zur Erhaltung von nit^- Phenotypen wiederholt. Auf diese Weise wurden nit^- Mutanten aus folgenden Wildstämmen isoliert: Aerobacter aerogenes, A. cloacae, Bacillus cereus, B. circulans, B. polymyxa, Pseudomonas aeruginosa, Serratia marcescens. Zur Züchtung von nit^- Mutanten von Bacillus circulans wurde dem Minimalagar von DAVIS und MINGIOLI (1950) 0.1 % Hefeextrakt zugesetzt, weil der Wildstamm Vitamin-auxotroph ist (vgl. PROOM und KNIGHT, 1950).

Tabelle 2

Chemisch- physikalische Eigenschaften von drei verschieden ve

Bodentyp		pH H ₂ O	KCl	CaCl ₂	CaCO ₃ %	H ₂ O %
I	Pseudogley-Braunerde					
	A _h (0- 17 cm)	6.7	5.2	5.8	0.11	23.8
	B _v A ₁ (17- 32 cm)	7.1	5.6	6.2	0.07	19.6
	B _w B _v (32- 70 cm)	7.1	5.6	6.1	0.06	14.1
	S _w (70-100 ⁺ cm)	7.2	5.5	6.0	0.04	15.8
II	Pseudogley					
	A _h 1 (0- 7 cm)	6.2	5.5	5.6	0.11	54.0
	A _h 2 (7- 15 cm)	6.6	5.5	5.5	0.10	31.7
	A _h 3 (15- 20 cm)	7.0	6.0	6.2	0.10	32.2
	S _w 1 (20- 40 cm)	7.2	5.9	6.5	0.10	23.8
	S _w 2 (40- 70 cm)	7.3	6.0	6.5	0.09	18.6
	S _d (70-120 ⁺ cm)	7.3	6.0	6.6	0.08	18.4
III	Gley					
	A _h 1 (0- 10 cm)	7.0	6.0	6.1	0.09	55.1
	A _h 2 (10- 18 cm)	7.0	5.8	6.1	0.09	38.4
	A _h G _o (18- 30 cm)	7.0	5.4	6.1	0.10	22.3
	G _o (30- 90 cm)	6.8	5.1	6.0	0.10	24.5
	G _r (90-120 ⁺ cm)	6.4	4.6	5.3	0.10	24.6

+) Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wird unter einem "trockenen Boden" immer ein sol bis zur Gewichtskonstanz getrocknet wurde.

rgleyten Böden; Prozente in mg je 1 g trockener Boden ⁺⁾

Glühverlust %	% Org.Substanz = C % x 1.724	C/N	NO ₃ ⁻ in mg/g	NH ₄ ⁺ in mg/g
4.8	4.3	10.2	0.71	Spur
2.1	1.7	9.1	0.11	-
1.0	0.6	8.8	0.10	-
1.1	0.6	1.6	0.06	-
13.1	12.0	10.2	1.57	-
7.1	6.8	10.7	0.24	Spär
5.4	5.0	9.7	1.56	"
2.3	1.9	7.3	0.87	"
1.5	1.1	6.2	0.63	-
1.4	0.9	4.7	0.34	-
13.1	11.9	9.9	0.62	Spur
4.9	4.7	7.6	0.57	0.06
1.3	0.9	6.4	0.14	-
1.2	0.8	7.9	0.17	-
1.0	0.8	5.0	0.12	-

cher verstanden der im Trockenschrank bei 105° C

IV. KAPITEL

Ergebnisse der Untersuchungen

I. Charakterisierung der Pseudogley-Braunerde, des Pseudogleys und des Gleys

4.1. Chemisch-physikalische Untersuchungen

Die Ergebnisse der durchgeführten chemisch-physikalischen Untersuchungen sind in Tabelle 2 zusammengefaßt. Nach der Bodenreaktion sind die 3 Bodentypen als mäßig sauer (pH KCl) einzustufen. Die Tendenz zur Versauerung ließe sich durch den geringen Kalkgehalt erklären. Während bei der pseudovergleyten Braunerde und beim Pseudogley die Reaktion mit zunehmender Tiefe leicht anstieg, war beim Gley eine zunehmende Versauerung im Unterboden festzustellen. Der Einfluß des Grundwassers machte sich durch einen pH-Abfall bemerkbar, welcher besonders bei pH(KCl) und pH(CaCl₂) deutlich wurde. Die steigende Versauerung des Unterbodens bei intensiver Vergleyung ist eine allgemeine Tendenz, erreicht aber nur selten pH-Werte unterhalb 5 (BLOOMFIELD, 1950), vorausgesetzt, daß der Boden ursprünglich neutral war.

Nach dem Gehalt an organischer Substanz im Oberboden sind die Versuchsböden als stark humos zu klassifizieren. Der geringe Gehalt an Humus in der Pseudogley-Braunerde dürfte im Vergleich zu den beiden anderen Profilen durch die ehemals ackerbauliche Nutzung dieses Bodens erklärt werden. Der Unterschied im Humusgehalt zwischen der Methode des Glühverlusts und einer Bestimmung aufgrund der Errechnung ($\% \text{ org. Subst.} = \text{C } \% \times 1.724$) könnten mitunter durch Feuchtigkeitsverluste und Dehydrierung der Eisenoxide ($\text{Fe}_2\text{O}_3 \cdot x \text{H}_2\text{O}$) durch Glühen gedeutet werden. Besonders im unteren Profilabschnitt könnte der Gewichtsverlust durch eine Dehydrierung des Hydrationswassers der noch meist amorphen Eisenoxide verursacht sein. Die Humusform ließe sich aus dem engen C/N Quotienten ableiten (etwa 10) und wäre demnach als stabil zu bezeichnen. Auch die geringe Konzentration an mineralisiertem Stickstoff könnte auf nur geringfügige Mineralisationsprozesse schließen lassen. Die ungünstige Molkenschicht (A_{h 2}-Horizont des Pseudogleys) machte sich durch ihren sehr geringen Nitrat-

gehalt bemerkbar, verglichen mit den darüber und darunter liegenden Horizonten. Dagegen zeichnete sich der $A_{h\ 2}$ -Horizont im Gleyprofil dadurch aus, daß er als einziger Horizont Stickstoff in Ammoniakform aufwies. Demgegenüber war der Horizont $A_{h\ 1}$ hier an der leichten Bleichung zu erkennen. Von allgemeiner Bedeutung für die potentielle Aktivität der Bodenorganismen ist das Vorkommen von organischer Substanz und Stickstoff in allen Horizonten bis zu einer Tiefe von 120 cm.

Differenzierung zwischen vergleyten- und pseudovergleyten Böden aufgrund der pedogenen Eisenoxide

In der Pseudogley-Braunerde, dem Pseudogley und dem Gley nimmt der Gesamtgehalt an Eisenoxiden (Fe_d) sowie ihr amorpher Anteil (Fe_o) mit zunehmender Tiefe ab. Nur im $A_{h\ 2}$ -Horizont des Pseudogleys und im $A_{h\ 1}$ vom Gley zeigte der Fe_d -Gehalt ein atypisches Verhalten. Im Pseudogley kann die Abnahme des Eisengehaltes im $A_{h\ 2}$ -Horizont durch eine Verlagerung in die darunter liegende Zone erklärt werden, was im Anstieg des Fe_d -Gehaltes im $A_{h\ 3}$ -Horizont zum Ausdruck kommt. Damit wäre auch die leichte Bleichung der "Molkenschicht" zu erklären. Auch der Anstieg des Fe_d -Gehaltes im $A_{h\ 2}$ -Horizont des Gleys kann durch eine Einwaschung von Eisenoxiden aus dem $A_{h\ 1}$ -Horizont gedeutet werden, weil auch in diesem Fall schon leichte Bleichungserscheinungen im $A_{h\ 1}$ -Horizont festgestellt wurden.

Zur Charakterisierung der pedogenen Eisenoxidformen hat sich der Aktivitätsgrad Fe_d/Fe_o im allgemeinen besser bewährt als das Kristallisationsmaß Fe_d/Fe_o . Aktivitätsgrade > 0.6 wurden in B_h - und B_s -Horizonten von Podsolen mehrfach nachgewiesen (vgl. SCHWERTMANN, 1964), während die Aktivitätsgrade im A_{lg} von schwach vergleyten Parabraunerden Werte zwischen 0.2 und 0.3 erreichten. Mit zunehmender Vergleyung stieg das Fe_d/Fe_o -Verhältnis bis auf 0.5 an (STRAUTZ, 1962). Wie aus Tab. 3 hervorgeht, wurde auch bei den untersuchten 3 Bodentypen mit zunehmender Pseudovergleyung bzw. Vergleyung eine Erhöhung des Aktivitätsgrades festgestellt: 0.38 für den S_w -Horizont der leicht pseudovergleyten Braunerde, 0.86 für den S_d -Horizont des Pseudogleys und 0.64 für die G_r -Zone des Gleys. Als Ursache ist wahrscheinlich die relative Zunahme der amorphen Eisenoxide mit steigender Reduktionsintensität in der Reihe $S_w \rightarrow S_d \rightarrow G_r$ anzunehmen. Demgegenüber gibt die Benutzung des Aktivitätsgrades Fe_d/Fe_o

Tabelle 3

Verteilung und Form der Eisenoxide in drei verschiedenen vergleyten Bodentypen

ppm / trockener Boden					
Bodentyp	Fe _r	Fe _d	Fe _o	Fe _o /Fe _d	Fe _r
	ppm	ppm	ppm		Fe _d -Fe _o
I Pseudogley-Braunerde					
A _h	2.0	1115.2	328.0	0.29	0.002
B A ₁	12.4	901.2	310.8	0.34	0.021
S _w B _v	10.7	811.3	217.3	0.27	0.018
S _w	5.9	474.4	177.9	0.38	0.019
II Pseudogley					
A _h 1	5.4	1795.2	1648.0	0.92	0.036
A _h 2	74.4	1252.9	626.4	0.50	0.118
A _h 3	21.6	1991.3	1041.5	0.48	0.020
S _w 1	31.1	1704.3	655.5	0.38	0.029
S _w 2	16.8	844.5	735.6	0.87	0.154
S _d	16.9	673.2	581.4	0.86	0.184
III Gley					
A _h 1	3.6	1558.2	1446.9	0.93	0.032
A _h 2	14.6	1829.3	813.0	0.44	0.014
A _h G _o	32.2	882.3	739.5	0.84	0.225
G _o	39.7	397.2	331.0	0.83	0.599
G _r	281.6	364.4	231.9	0.64	2.125

keinen Aufschluß darüber, ob es sich um Vergleynungs- oder Pseudovergleyungsprozesse handelt, weil der Parameter Fe_o keine Differenzierung zwischen amorphen dreiwertigen- oder zweiwertigen Eisenoxiden ermöglicht. Deshalb wurde ein "Vergleyungsindex" mit Hilfe nachfolgender Formel errechnet:

$$\frac{Fe_r}{Fe_d - Fe_o}$$

In diesem Quotienten berücksichtigt Fe_r die Konzentration an Eisen(II)-Ionen, und die Differenz $Fe_d - Fe_o$ entspricht dem Kristallisationsgrad der Eisenoxide. Mit Hilfe dieses Index gelang es, eindeutig zwischen den Pseudovergleyungs- und Vergleyungsstadien zu differenzieren (s. Tab. 3). Die Vorteile des Begriffes Vergleyungsindex sind

1. der große Differenzierungsbereich zwischen oxidierten und reduzierten Verhältnissen im Boden (in der Tab. 3 zwischen 0.002 und 2.1),
2. die Erfassung der 3 wichtigsten pedogenetischen Parameter des anorganischen Redox-Systems,
3. die Möglichkeit pseudovergleyte und vergleyte Stadien im Unterboden zu unterscheiden.

Ein Vergleich der Konzentration an Eisen(II)-Ionen allein wäre nicht ausreichend zur Charakterisierung des Zustandes der Eisenoxide gewesen, denn bei etwa gleichem Gehalt an Ferroionen (vgl. z.B. der Fe_r -Gehalt vom A_{hO} (Gley) mit dem S_{w1} (Pseudogley) ließen sich stark differenzierte Vergleyungsindizes (0.225 bzw. 0.029) nachweisen. Die Bedeutung der Charakterisierung des Kristallisationsgrades beruht auf der direkten Abhängigkeit dieses Parameters von der Alterungsdauer und von den Alterungsbedingungen. Je ausgeprägter die Trockenphase in der wechselfeuchten Zone war, um so stärker trat das Ausmaß der Kristallisation in Erscheinung (LUDWIEG, 1956). Im allgemeinen wirken starke Durchfeuchtung, organische Substanz und evtl. auch Phosphate hemmend auf die Alterung (SCHWERTMANN, 1964), während mit steigendem pH-Wert der amorphe Anteil abnimmt, bei gleichzeitig zunehmender Konzentration am Gesamteisengehalt (SCHACHTSCHABEL und HEINEMANN, 1964). Im Oberboden wäre folglich der niedrige Vergleyungsindex in erster Linie auf die kristallisationshemmende Wirkung der organischen Substanz zurückzuführen. Reduzierende Verhältnisse durch Nässe im A-Horizont,

wie z. B. in der Molkenschicht (A_{h2} -Horizont des Pseudogleys), machen sich darüberhinaus neben der organischen Substanz im Vergleynsindex deutlich bemerkbar.

Der Vergleynsindex wäre an weiteren Profilen auf seine Brauchbarkeit zu überprüfen. Dabei sollte man nicht nur seine Bedeutung als Maß der Vergleynung, sondern auch seine Brauchbarkeit zur relativen Abstufung des Alters der Gleye prüfen.

4.2. Quantitative mikrobiologische Untersuchungen

A. Differenzierung durch quantitative Populationsuntersuchungen

Ein vergleichender Überblick über die vertikale Verbreitung von Bakterien, Pilzen, Actinomyceten und Algen der untersuchten Böden ist in Abb. 1 graphisch dargestellt.

1. Die Verteilung der Bakterien

Die Zählung der Bakterienkeime erfolgte auf dem verstärkten Bodenextrakt-Glucose Agar. Der Bakterienbesatz lag bei den 3 hydromorphen Profilen im A-Horizont etwa in der gleichen Größenordnung, und entsprach der allgemeinen Häufigkeit von Bakterien im Oberboden. Eine deutliche Differenzierung zeigten die drei Bodentypen erst im Unterboden. Während im Gleyprofil die Bakterienpopulation im Unterboden in der Größenordnung 10^5 lag, betrug der Besatz in der Pseudogley-Braunerde und im Pseudogley zwischen 10^7 und 10^6 Keimen je g trockenen Boden. Das Gleyprofil bietet bei fast gleichen Ausgangsbedingungen in seiner Gesamtheit den Bakterien einen ungünstigeren Biotop als die pseudovergleyten Böden. Vor allem dürfte sich hier die stärkere Versauerung des Unterbodens ausgewirkt haben. Diese Ergebnisse bestätigten die Beobachtungen von SCHOLZ-KÖNIG (1966) an einer Gley-Braunerde. Weniger ausgeprägt schien der permanent gesättigte G_r -Horizont auf die aerobe Flora zu wirken, denn zwischen dem G_o - und dem G_r -Horizont war der Unterschied im Bakterienbesatz nur gering. Diese Befunde mit dem Bodenextrakt-Glucose Agar wurden durch die Ergebnisse mit dem verstärkten Glycerin-Pepton Agar in ihrer Tendenz bestätigt, obwohl im ganzen kleinere Populationen ermittelt wurden Tab. 4.

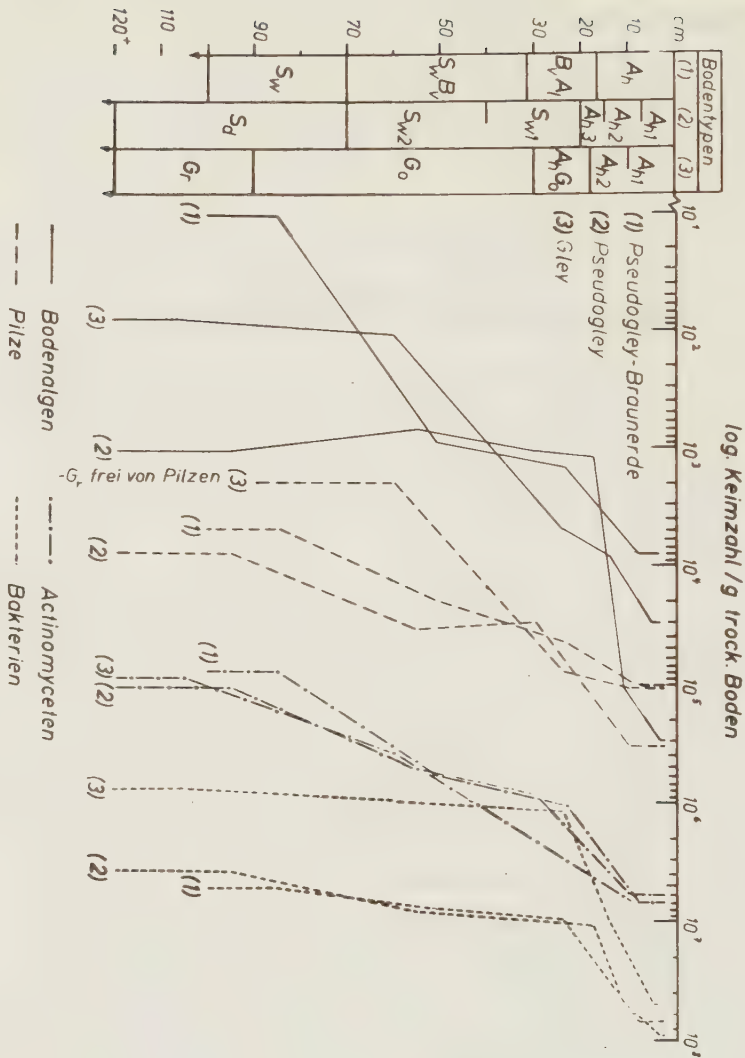


Abb. 1: Verteilung der Bakterien, Actinomyceten, Pilze und Algen in drei verschiedenen vergleyten Böden

Die größten Unterschiede beider Medien wurden im Unterboden der Pseudogley-Braunerde festgestellt. Die Ergebnisse wurden aus den 4 Parallelen errechnet und die Standardabweichung

$$S_{\bar{x}} = \sqrt{\frac{\sum x^2 - (\sum x)^2/n}{n-1}}$$

in Prozenten ausgedrückt. Diese relative Standardabweichung, $S_{\bar{x}}$ (ein Maß für die Streuung) schwankte bei Methode A zwischen 4,1 und 15,5 %, bei Methode B zwischen 4,8 und 18,8 %. Aufgrund der geringen Freiheitsgrade ($n-1=3$) wurde

Tabelle 4

Bakterienpopulationen in Abhängigkeit von der Bodentiefe in 3 hydromorphen Böden. Keimzahlen in Millionen/g trock. Boden, bestimmt mit einem verstärkten Bodenextrakt-Glucose Agar (Medium A) und einem verstärkten Glycerin-Pepton Agar (Medium B)

I.	Pseudogley-Braunerde	Medium A	Medium B
	A _h (0- 17 cm)	55,7	36,3
	B _v A ₁ (17- 32 cm)	11,2	7,6
	S _w B _v (32- 70 cm)	6,9	1,5
	S _w (70-100 cm)	3,6	0,39
II.	Pseudogley		
	A _h 1 (0- 7 cm)	81,9	55,1
	A _h 2 (7- 15 cm)	29,5	17,2
	A _h 3 (15- 20 cm)	13,8	11,8
	S _w 1 (20- 40 cm)	9,4	7,7
	S _w 2 (40- 70 cm)	6,2	4,1
	S _d (70-120 cm)	2,5	1,8
III.	Gley		
	A _h 1 (0- 10 cm)	35,6	28,9
	A _h 2 (10- 18 cm)	10,8	10,3
	A _h G _o (18- 30 cm)	1,3	0,90
	G _o (30- 90 cm)	1,2	1,06
	G _r (90-120 cm)	0,63	0,51

die Sicherung in den Unterschieden beider Medien nicht weiter verfolgt. Diese Resultate bedeuten, daß schon die Wahl des Agar-Mediums eine gewisse Selektion innerhalb der Gesamtflora von Bakterien nach sich zieht, und dadurch die Gesamtflora als Bezugsgröße in Frage gestellt wird.

Einfluß der Lagerungsdauer auf den Bakterienbesatz der Proben

Mit den quantitativen Untersuchungen wurde 3 Tage nach der Probenahme begonnen (am 9.5.1967). Alle nachfolgenden Untersuchungen wurden möglichst schnell an den im Kühlschrank (4° C) gelagerten, ungestörten Bodenproben durchgeführt. Nach jeweils 3 bzw. 6 Monaten wurde die Gesamtzahl der Bakterien nochmals bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tab. 5 aufgeführt.

Tabelle 5

Einfluß der Lagerung (4° C) auf den Gesamtbakterienbesatz der frischen Proben. Keimzahlen bestimmt mit einem verstärkten Bodenextrakt-Glucose Agar mit Zusatz von 0.001 % TTC. Zahlen in Millionen / g trock. Boden.

Besatz am 12.5.1967		Verlust nach			
		3 Monaten		6 Monaten	
I.	Pseudogley-Braunerde	in %	Ø	in %	Ø
	A _h	55,7	10,2(18,6)	32,0(58,5)	
	B _v A _l	11,2	1,5(13,4)	6,2(55,4)	
	S _w B _v	6,9	2,1(30,0)	4,4(62,9)	61,5
	S _w	3,6	0,6(16,7)	2,5(69,4)	
II.	Pseudogley				
	A _h 1	81,9	8,4(10,2)	18,2(22,2)	
	A _h 2	29,5	1,7(23,8)	17,6(59,7)	
	A _h 3	13,8	1,7(12,3)	4,9(35,5)	
	S _w 1	9,4	1,8(20,2)	3,7(39,4)	36,1
	S _w 2	6,2	1,5(24,2)	3,3(53,2)	
	S _d	2,5	0,5(20,0)	1,5(60,0)	
III.	Gley				
	A _h 1	35,6	2,9(8,2)	10,9(30,6)	
	A _h 2	10,8	1,4(13,0)	3,5(32,4)	
	A _h G _o	1,3	0,3(23,1)	0,9(70,0)	49,4
	G _o	1,2	0,1(9,1)	0,66(60,0)	
	G _r	0,63	0,09(14,3)	0,34(53,9)	

Tab. 5 zeigt, daß nach einer dreimonatigen Lagerperiode im Kühlraum, die bakterielle Gesamtfloora um 13,5 bis 19,7 % zurückgegangen war. Nach einer Verdoppelung dieser Lagerungsdauer war die ursprüngliche Population sogar um 36,1 bis 61,5 % verringert worden. Obwohl die Populationsuntersuchungen nach 3 Monaten abgeschlossen waren, sollten bei der Interpretation der folgenden quantitativen Untersuchungsergebnisse immer nur Zahlen vergleichbarer physiologischer Gruppen verglichen werden. Deshalb wurden, wie im folgenden zu zeigen sein wird, die Ergebnisse nur zur Erkennung allgemeiner Tendenzen herangezogen.

2. Die vertikale Verteilung der Actinomyceten und Pilze

Auch die Verteilung der Actinomyceten in den 3 vergleyten Böden ist in Abb. 1 in logarithmischem Maßstab aufgezeichnet. Die Populationsdichte wurde anhand der Ergebnisse mit Bengalrosa-Malzextrakt Agar (OTTOW und GLATHE, 1968) ermittelt. Der Besatz nahm mit zunehmender Profiltiefe von etwa 4 bis 5 Millionen Einheiten je g trockenen Bodens auf etwa 10 bis 70 Tausend im Unterboden ab. Der Rückgang war am deutlichsten im S_d -Horizont des Pseudogleys. Obwohl die Actinomyceten bevorzugt aerob wachsen, müssen doch einige Arten in der Lage sein, bei geringem Sauerstoffzutritt zu existieren, um überhaupt das Vorkommen von diesen Organismen im G_r -Horizont erklären zu können. Nach MICHOUSTIN (1956) sind gerade die Actinomyceten mit einem der stärksten zymogenen Enzymsysteme ausgerüstet, wodurch sie intensiv am fermentativen Abbau der organischen Substanzen beteiligt sind. Daß dabei Reduktionsprozesse auftreten können, ist nicht ausgeschlossen, zumal RABOTNOVA et al. (1963) in Kulturen von Actinomyces aureofaciens einen starken Abfall des Redoxpotentials beobachten konnten.

Stärker noch als bei den Actinomyceten wirkte sich die permanent wassergesättigte, reduzierende Zone des Gleyprofils auf die Schimmelpilze aus. Schon im G_o -Horizont war der Pilzbesatz wesentlich geringer als in den entsprechenden S_{wV} (Pseudogley-Braunerde)- und S_{w2} (Pseudogley)-Horizonten (s. Abb. 1). Aus dem G_r -Horizont ließen sich Pilze überhaupt nicht mehr isolieren, auch nicht in den geringeren Verdünnungsstufen (10^{-1} - 10^{-3}). Schon LOUB (1960) stellte in dem vergleyten Bodenbereich eines Gleys keine Pilze mehr fest. Obwohl die meisten Pilze bekanntlich aerobe Biotope bevorzugt besiedeln, darf doch nicht daraus geschlossen werden, daß deshalb die Pilze in den vergleyten Zonen fehlen. In diesem Zusammenhang sind die Versuche von MITCHELL und ALEXANDER (1962)

an künstlich überfluteten Bodenproben sehr aufschlußreich. Diese Forscher konnten nämlich keine Beziehung zwischen der Abnahme der Pilzzahlen einerseits, und der zunehmenden Versauerung und Strukturverschlechterung nach der Bewässerung andererseits, feststellen. Wurde jedoch dem Boden vor der Wassersättigung Sucrose zugesetzt, so verringerte sich die Pilzpopulation noch drastischer. Sie folgerten, daß die Hemmung der Pilzflora nicht nur durch Sauerstoffmangel hervorgerufen wurde, denn die Populationsabnahme in den aerob inkubierten Proben war wesentlich größer als in den anaerob bebrüteten Parallelen. MITCHELL und ALEXANDER halten vielmehr die Abnahme des Redoxpotentials, die Anhäufung von Ferro- und Mangano-Verbindungen sowie die Bildung von CO_2 und H_2S dafür für verantwortlich.

Zum Problem der quantitativen Erfassung von Actinomyceten und Pilzen mit Bengalrosa-Malzextrakt Agar

Das relativ langsame Wachstum der Actinomyceten führt bei der Zählung auf Platten nach der Methode KOCH vielfach zur Maskierung mancher Kolonie durch die schneller wachsenden und sich zum Teil stark ausbreitenden Bakterien und Pilze. Mehrere Spezialnährböden wurden entwickelt mit dem Zweck durch Zusatz von bestimmten Stimulantien (vgl. CORKE und CHASE, 1956) oder selektiv hemmenden Antibiotika (vgl. WILLIAMS und DAVIES, 1965) das Erfassen der Actinomyceten zu verbessern. Auch die Anspruchslosigkeit dieser Gruppe gegenüber der Stickstoffform wurde benutzt, um das Aufkommen von Bakterien und Pilzen zu unterdrücken (z.B. beim Haferagar). Als sehr erfolgreich erwies sich in diesem Zusammenhang auch der synthetische, Glycerin-Glykokoll Agar nach von PLOTHO (1940). Wenn jedoch von den Bodenproben neben Actinomyceten auch Pilzbestimmungen durchgeführt werden müssen, wie dies bei serienmäßigen Untersuchungen oft der Fall ist, bedient man sich zuweilen anderer, angesäuerten Medien, die besonders das Aufkommen von Bakterien erschweren. Zur Hemmung von Bakterienkeimen bei der Bestimmung von Pilzeinheiten wurde mit Erfolg von SMITH und DAWSON (1944) erstmalig der Farbstoff Bengalrosa verwendet. Bei der gleichzeitigen Bestimmung von Actinomyceten und Pilzen in unseren Versuchsböden, wurde daher der Bakterien-Inhibitor Bengalrosa kombiniert mit dem für Pilzwachstum günstigen Malzextrakt, wobei das pH auf 6,0 - 6,2 angehoben wurde. Um die Entwicklung der Actinomyceten zu fördern, wurden außerdem Spuren-

Tabelle 6

Verteilung der Keimzahlen von Actinomyceten und Pilzen
in einer Pseudogley-Braunerde, einem Pseudogley und in
einem Gley. Keimzahlen pro g trockener Boden

2 % Malzextrakt		Bengalrosa-Malzextrakt	Glycerin-Glykokoll	Glucose-Asparagin	Hafer
Agar	Pilze x 10 ⁴	Agar	Agar	Agar	Agar
		Actinomyceten x 10 ⁶			
I. Pseudogley-Braunerde					
A _h	11,26	14,00	5,20	5,98	1,95
B _V I	2,88	3,30	1,32	0,72	0,72
S _B _w v	1,48	0,67	0,46	0,23	0,34
S _w	0,34	0,013	0,066	0,038	0,036
II. Pseudogley					
A _h	21,35	23,65	4,25	5,78	2,21
S _w 1	1,93	2,17	0,78	1,30	0,52
S _w 2	2,75	2,55	0,36	0,36	0,52
S _d	0,60	0,60	0,12	0,038	0,038
III. Gley					
A _h	11,50	11,50	4,60	3,68	3,68
A _h G _o	5,75	5,40	2,04	2,38	2,04
G _o	0,21	0,21	0,25	0,13	0,13
G _r	-	-	0,072	0,036	0,038
Insgesamt:		64,18	19,518	20,672	12,222

elemente zugesetzt (vgl. COCHRANE, 1961). Auf den Zusatz von Bodenextrakt wurde verzichtet, da seine fördernde Wirkung in erster Stelle auf Spurenelementen beruht, und der Bedarf an Wirkstoffen ausreichend gesichert ist durch Malzextrakt (Biomalz) als Grundsubstanz. In einem quantitativen Versuch wurde dieser Bengalrosa-Malzextrakt Agar (OTTOW und GLATHE, 1968) für die Bestimmung von Pilzen mit einem 2 %igen Malzextrakt Agar (pH = 5,0) und für die Erfassung von Actinomyceten mit

- (1) dem Glycerin-Glykokoll Agar nach VON PLOTHO (1940),
 - (2) dem universal Glucose-Asparagin Agar von Waksman (MÜLLER, 1965),
 - (3) dem klassischen Haferagar, zubereitet nach AHRENS (1967)
- verglichen.

Die Ergebnisse sind in Tab. 6 zusammengestellt.

Die höchste Populationsdichte der Actinomyceten wurde auf von PLOTHOS Glycerin-Glykokoll Agar festgestellt, dicht darauf folgte der Bengalrosa-Malz-

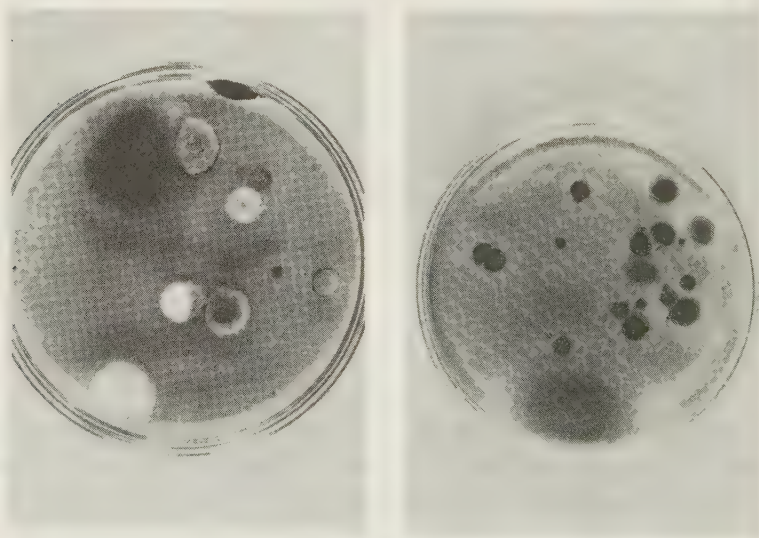


Abb. 2: Pilz- und Actinomyceten-Kolonien auf Bengalrosa-Malzextrakt Agar. Links, Pilze (10^{-4}) auf Oberseite, rechts Actinomyceten (10^{-5}) von Unterseite der Platte betrachtet. Bebrütung 10 bis 14 Tage bei 25° C.

extrakt Agar. Glycerin-Glykokoll hat jedoch den Nachteil, daß sowohl Bakterien als auch Actinomyceten als weiße Kolonien erscheinen und somit eine Differenzierung erschweren. Dagegen sind die Bengalrosa-Malzextrakt Agar-Platten fast frei von Bakterien und die Actinomyceten erscheinen als runde, intensiv rosa gefärbte Kolonien. Auch kleine, im Agar gewachsene Kolonien ließen sich leicht erkennen und zählen (s. Abb. 2). Wie zu ersehen ist, lassen sich die intensiv rosa gefärbten Actinomyceten besonders von der Plattenunterseite gut erfassen. Auf Bengalrosa-Malzextrakt Agar wurden sogar Pilzkolonien häufiger gezählt als auf dem Standard Malzagar. Der Zusatz von Bengalrosa hatte außerdem den Vorteil, daß die Pilzkolonien eine geringe Tendenz zur Rasenbildung aufwiesen (s. Abb. 2).

Varianzanalytische Überprüfung der Unterschiede und Genauigkeit zwischen Bengalrosa-Malzextrakt Agar und Glycerin-Glykokoll Agar

Zur Prüfung, ob die beobachteten Unterschiede in der Actinomycetenflora zwischen den oben erwähnten Medien signifikant sind, und ob ein Unterschied in der Genauigkeit beider Medien feststellbar ist, wurden beide Nährsubstrate einem Vergleich unterzogen. Dazu wurde 20 g lufttrockener Boden (Göttinger Löß-Lehm) wie üblich eine Stunde mit 0,18 % Na-Pyrophosphat geschüttelt, dezimal verdünnt und von jeder Verdünnungsstufe (10^{-1} - 10^{-8}) 10 Parallelen gegossen. Die Auszählung erfolgte nach 10 Tagen, worauf die Werte varianzanalytisch ausgewertet wurden (LINDER, 1960).

a. Zur Prüfung der Unterschiede in den Ergebnissen wurde der verteilungsfreie Test von WILCOXON benutzt. Geprüft wurde mit einer zweiseitigen Vertrauenswahrscheinlichkeit von $P = 0,95$, d.h. bei einer einseitigen Sicherheitsschwelle von 2 1/2 %. Aus den Ergebnissen wurde ein Q-Wert von 65 ermittelt ($n_1 = n_2 = 10$), welcher den Grenzwert $Q = 54$ eindeutig überschritten hat. Die Unterschiede der beiden Methoden sind somit signifikant, was bedeutet, daß Bengalrosa-Malzextrakt Agar eine kleinere Actinomycetenpopulation erfaßt als der Glycerin-Glykokoll Agar.

b. Zur Sicherung der Differenz in der Genauigkeit beider Methoden wurde der F-Test angewendet. Geprüft wurde ebenfalls mit einer einseitigen Sicherheitsschwelle von 2 1/2 %. Bei 9 Freiheitsgraden besteht ein Sicherheitspunkt $F = 3,1$, der von dem ermittelten Streuungsverhältnis $F = 1,1$ nicht überschritten wurde. Es besteht demnach kein gesicherter Unterschied in der Genauigkeit der geprüften Medien bei der quantitativen Erfassung von Actinomyceten.

3. Die Verbreitung der Bodenalg

Schon im Oberboden unterschieden sich die 3 Bodentypen beträchtlich in der Verteilung von Algen (s. Abb. 1). Am höchsten war der Algenbesatz im A_{h1} -Horizont des Pseudogleys ($2,0 \times 10^5$ Algeneinheiten / g trock. Boden), gefolgt vom

A_{h1} -Horizont des Gleys ($2,1 \times 10^4$ Einheiten / g trock. Boden) und vom A_h -Horizont der Pseudogley-Braunerde ($5,9 \times 10^3$ Einheiten / g trock. Boden). Diese starken Unterschiede in den obersten Horizonten hängen wahrscheinlich nicht nur direkt mit den Differenzen in der Bodenfeuchtigkeit zusammen (54,0, 55,1 bzw. 23,8 % H_2O), sondern auch mit dem Reduktionszustand dieser Zonen. Denn obwohl der A_{h1} -Horizont (Gley) am feuchtesten war (55,1 % H_2O), lag die Algenpopulation etwa eine Zehnerpotenz tiefer als beim A_{h1} -Horizont des Pseudogleys. Das leicht reduzierende Milieu im A_{h1} -Horizont des Gleys hat sich hier wahrscheinlich hemmend ausgewirkt. Indirekt wurde die Wirkung des Wassers bedingt durch den Gehalt an organischer Substanz. Wie der Algenbesatz war auch er am niedrigsten im A_h -Horizont der pseudovergleyten Braunerde. In den auf den A-Horizont folgenden Zonen verringerten sich die Unterschiede wieder deutlich (s. Abb. 1), um mit zunehmender Bodentiefe erneut hervorzutreten. Auch im Unterboden dürfte die Rolle des Wassers entscheidend sein. Der Wassergehalt nahm vom S_w -Horizont (Pseudogley-Braunerde) über den S_d -Horizont (Pseudogley) bis zum G_r -Horizont (Gley) zu (Tab. 2), die Algenpopulation dieser Zonen jedoch in der Reihenfolge Pseudogley-Braunerde < Gley < Pseudogley. Obwohl der G_r -Horizont am feuchtesten war, wurde doch eine kleinere Population als im S_d -Horizont nachgewiesen. Hier könnte aber der Unterschied pH-bedingt sein. Es ist bekannt, daß die Mehrzahl der Cyanophyceen und Diatomeen neutrale bis leicht alkalische Biotope bevorzugen, während die Chlorophyceen in dem sauren pH-Bereich von pH 4,7-6,5 dominieren (LUND, 1967). Im übrigen wird das Vorkommen einer Algenpopulation in den vom Stauwasser geprägten Profilzonen vermutlich auf eingespülte und/oder fakultativ heterotrophe Arten zurückzuführen sein.

B. Differenzierung aufgrund einiger physiologischer Gruppen der Bodenbakterien

Ein Bodentyp stellt in seiner Gesamtheit ein Entwicklungsstadium dar, in dem die klimatischen, lithogenen, phytogenen und edaptischen Faktoren im Gleichgewicht stehen. Die Resultante dieser komplexen Faktoren ist um so ausgeprägter, je stärker die synergistische Wechselwirkung zweier oder mehrerer Einzelfaktoren hervortritt. Ob die vom Wasser ausgelösten Aktualitätsmerkmale der hydro-morphen Böden auf der Wirkung des Wassers allein, oder auf der Wechselwirkung

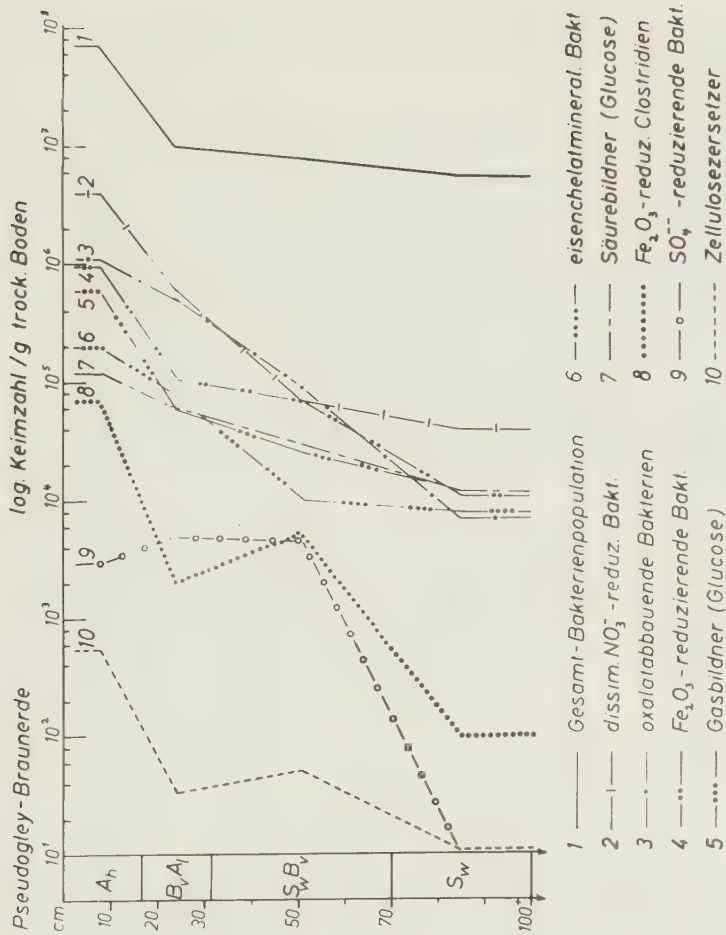


Abb. 3: Verbreitung einiger physiologischer Gruppen der Bodenbakterien in einer Pseudogley-Braunerde

Wasser-Boden-Mikroorganismen beruht, könnte sich durch das Hervortreten bestimmter physiologischer Bakteriengruppen - in diesem Falle besonders die des Eisenkreislaufes - deuten lassen. Ein Überblick einiger wichtiger Bakteriengruppen des C, N und Fe-Kreislaufes ist in den Abb. 3, 4 und 5 für die drei Versuchsböden in logarithmischem Maßstab aufgezeichnet.

1. Einfluß regionaler Milieufaktoren auf die Verbreitung von aeroben und anaeroben Bakterien

Von den Standortfaktoren machten sich die örtlichen Reduktionserscheinungen im Oberboden (Bleichung) auch bei den Bakterien bemerkbar. Dies gilt für die "Molkenschicht" ($A_{h\ 2}$) des Pseudogleys und für den $A_{h\ 1}$ -Horizont des Gleys. Betroffen waren in erster Stelle die Gruppen der obligat anaeroben Organismen, wie der sulfatreduzierenden Bakterien, der Fe_2O_3 -reduzierenden Clostridien und der Gasbildner (s. Abb. 4 und 5). Im Gegensatz dazu blieben die übrigen geprüften, meist aeroben Organismengruppen unbeeinflusst, ebenso die eisenreduzierende Gesamtflora. Aufschluß über den Zustand des Bodens gab weiter das Verhalten von Azotobacter sp., wie aus Tab. 7 hervorgeht.

Tabelle 7

Das Azotobacter-Vorkommen in 3 hydromorphen Böden. Keimzahlen je g trockener Boden

Pseudogley-Braunerde		Pseudogley		Gley	
A_h	-	$A_{h\ 1}$	$1,4 \times 10^3$	$A_{h\ 1}$	$0,7 \times 10^1$
$B_v A_1$	-	$A_{h\ 2}$	$4,4 \times 10^1$	$A_{h\ 2}$	-
$S_w B_v$	$7,7 \times 10^1$	$A_{h\ 3}$	$1,0 \times 10^1$	$A_{h\ G_o}$	-
S_w	-	$S_w 1$	$0,9 \times 10^1$	G_o	-
		$S_w 2$	$1,6 \times 10^1$	G_r	-
		S_d	-		

Aus Tab. 7 ist ersichtlich, daß ein aerober Organismus wie Azotobacter sp. zwar in den reduzierten Regionen des $A_{h\ 2}$ (Pseudogleys) und $A_{h\ 1}$ (Gleys) vorkommt, aber nicht in dem besser durchlüfteten Oberboden der Pseudogley-Braunerde. Die

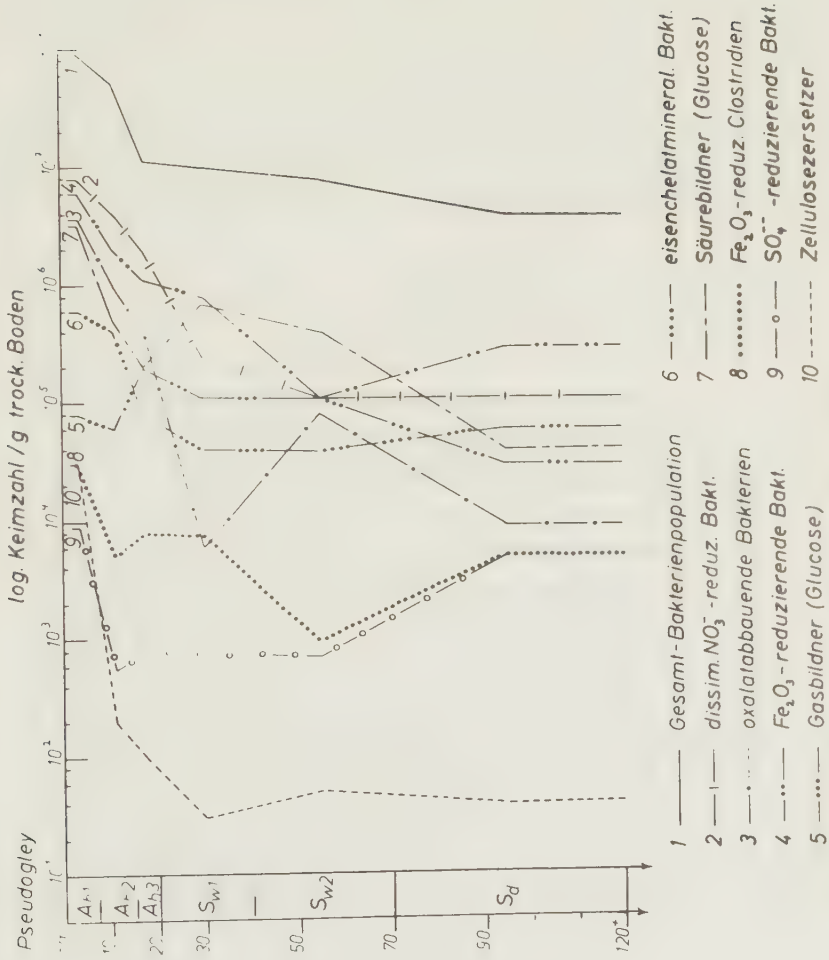


Abb. 4: Verbreitung einiger physiologischer Gruppen der Bodenbakterien in einem Pseudogley.

pseudovergleyten- und vergleyten Horizonte des Unterbodens sind dagegen frei von diesem aeroben Luftstickstoffbindner. Die Wirkung der Staunässe im Unterboden zeigte dagegen bei manchen anderen physiologischen Gruppen eine fördernde Wirkung. So erbrachten im allgemeinen die MPN der sulfatreduzierenden Bakterien, der Fe_2O_3 -reduzierenden Clostridien, der heterotrophen eisenmineralisierenden und der eisenreduzierenden Gesamtflora eine leicht ansteigende Tendenz im unteren Profilabschnitt des Pseudogleys und des Gleys. Im Gley kamen außerdem die Zellulosezersetzer sowie die Gruppen der gas- und säurebildenden Organismen noch dazu. Die Frage, ob es sich hier um autochtone oder vom Sicker- bzw. Grundwasser angeführte Keime handelte, bleibt offen. Interessant ist jedoch, daß sich das anorganische, reduzierte Milieu im Unterboden anders auf die Flora auswirkt als die reduzierten, organischen Zonen des Oberbodens.

2. Die Mikrobiologie des Eisenkreislaufes

Die Verbreitung der eisenmineralisierenden Bakterien

Die für die Mineralisation von verlagerungsfähigen Eisenkomplexen wichtigen Gruppen der oxalatabbauenden und eisenzitratmineralisierenden Bakterien unterschieden sich in den 3 untersuchten Böden besonders im Unterboden. Während in der Pseudogley-Braunerde diese beiden Gruppen mit zunehmender Tiefe abnahmen, zeigten Gley und Pseudogley charakteristische, aber homologe Tendenzen. Sowohl im $\text{S}_{\text{w}2}$ -Horizont als im G_0 -Horizont des Pseudogleys bzw. Gleys stieg die Zahl der oxalatabbauenden Bakterien erneut an, um in dem S_{d} - und G_{r} -Horizont wieder deutlich rücklaufende Tendenzen zu zeigen. Etwa entgegengesetzt verhielt sich die eisenchelatmineralisierende Flora, die in dem $\text{S}_{\text{w}2}$ - und G_0 -Horizont mehr oder weniger ausgeprägte Minima aufwiesen, dagegen in den nachfolgenden wasserführenden Zonen geringfügig anstieg. Der Verlauf der eisenchelatmineralisierenden Population, gemessen an der Zahl der ferriammoniumcitratverwertenden Bakterien mit dem Gußplattenverfahren, wurde durch das Ergebnis der MPN-Methode bestätigt (s. Tab. 8). Aus der Tab. 8 ist zu entnehmen, daß die Ergebnisse des Gußplattenverfahrens mit der Methode zur Ermittlung der MPN in ihrer Tendenz übereinstimmen. Mit Ausnahme von den Horizonten $\text{A}_{\text{h}3}$ und $\text{S}_{\text{w}1}$ (Pseudogley) liegen die Werte des Gußplattenverfahrens innerhalb des Annahmebereichs mit einer Wahrscheinlichkeit von 95 %.

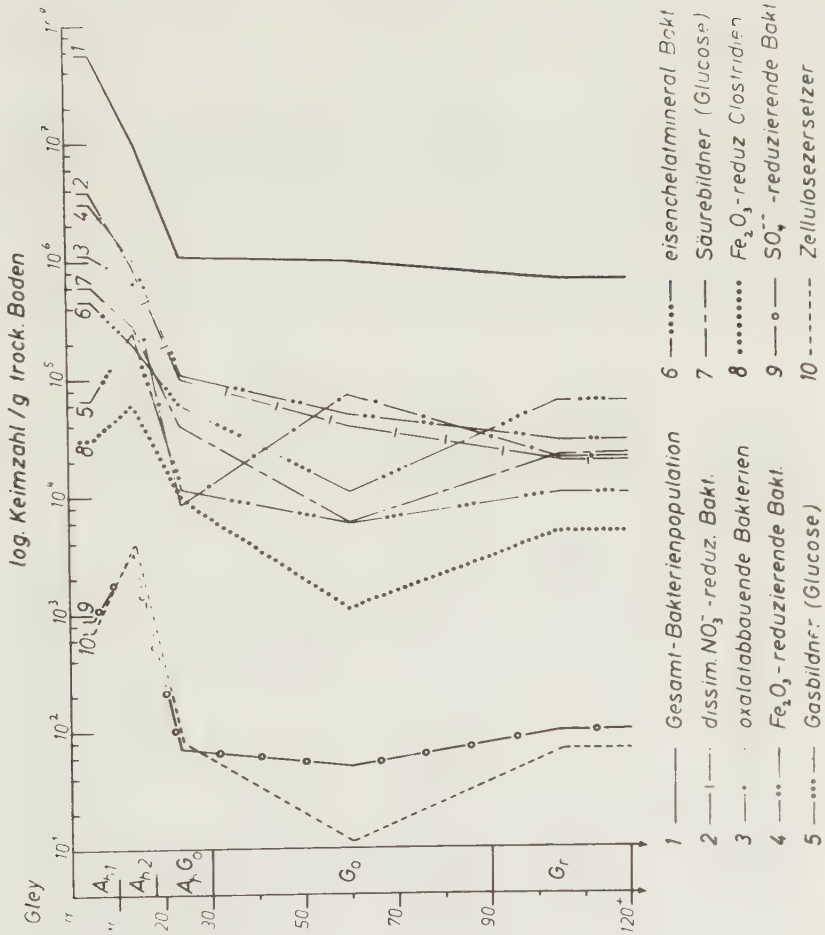


Abb. 5: Verbreitung einiger physiologischer Gruppen der Bodenbakterien in einem Gley

Daß die in den Abb. 3, 4 und 5 graphisch dargestellten Werte der Plattenzählung entstammen, beruht in der Tendenz, dem Gußplattenverfahren mehr Vertrauen zu schenken als den Ergebnissen, die man mit dem Grenzverdünnungsverfahren zur Ermittlung der MPN erhält (TAYLOR, 1962). Bemerkenswert ist weiterhin, daß auch DOMMERGUES und DUCHAUFOR (1965) eine ähnlich verlaufende Entwicklung der eisenchelatmineralisierenden Bakterienflora bei einigen der untersuchten vergleyten, lessivierten Braunerden feststellten.

Tabelle 8

Vergleich der Populationsdichte (Keimzahlen je g trock. Boden) der eisenchelatmineralisierenden Bakterien, bestimmt nach dem Gußplattenverfahren und der Methode der MPN. Obere (μ_o) und untere (μ_u) Vertrauensschwelle der MPN bei einer Wahrscheinlichkeit $P = 0,95$.

	Plattenmethode	MPN	μ_u	μ_o
I. Pseudogley-Braunerde				
A _h	$1,7 \times 10^5$	$1,3 \times 10^5$	$2,7 \times 10^4$	$5,9 \times 10^5$
B _v A ₁	$6,1 \times 10^4$	$5,6 \times 10^4$	$1,2 \times 10^4$	$2,6 \times 10^5$
S _w B _v	$1,0 \times 10^4$	$1,7 \times 10^3$	$3,7 \times 10^3$	$8,1 \times 10^4$
S _w	$7,5 \times 10^3$	$3,0 \times 10^4$	$6,3 \times 10^3$	$1,4 \times 10^5$
II. Pseudogley				
A _h 1	$4,1 \times 10^5$	$2,1 \times 10^6$	$4,4 \times 10^5$	$9,7 \times 10^6$
A _h 2	$2,7 \times 10^5$	$3,7 \times 10^5$	$7,9 \times 10^4$	$1,7 \times 10^6$
A _h 3	$0,6 \times 10^5$	$1,4 \times 10^6$	$3,0 \times 10^5$	$6,6 \times 10^6$
S _w 1	$0,26 \times 10^5$	$5,9 \times 10^5$	$1,3 \times 10^5$	$2,8 \times 10^6$
S _w 2	$0,25 \times 10^5$	$1,2 \times 10^6$	$2,5 \times 10^4$	$5,5 \times 10^6$
III. Gley				
A _h 1	$2,8 \times 10^5$	$1,0 \times 10^6$	$2,1 \times 10^5$	$4,7 \times 10^6$
A _h 2	$1,7 \times 10^5$	$4,1 \times 10^5$	$8,7 \times 10^4$	$1,9 \times 10^6$
A _h G _o	$4,0 \times 10^4$	$1,2 \times 10^5$	$2,6 \times 10^4$	$5,7 \times 10^5$
G _o	$1,3 \times 10^4$	$3,3 \times 10^4$	$7,1 \times 10^4$	$1,5 \times 10^5$
G _r	$4,4 \times 10^4$	$6,0 \times 10^4$	$1,3 \times 10^4$	$2,8 \times 10^5$

Die oben erwähnten Ergebnisse könnte man so interpretieren, daß die Eisenver-

lagerung in Form von organischen Komplexen in den unteren Horizonten des Pseudogleys und Gleys gering sein muß infolge der hohen Anteile an oxalat- und citratabbauenden Bakterien. Die Naßbleichung, Vergleyung und evt. nachfolgenden Verlagerungsvorgänge des Eisens setzen vielmehr eine Reduktion voraus.

Vorkommen der potentiellen eisenreduzierenden Bakterien

Aus den Abb. 3, 4, 5 ist die vertikale Verteilung der eisenreduzierenden Bakterienflora in der pseudovergleyten Braunerde, in dem Pseudogley und im Gley ersichtlich. In allen drei Profilen war die Zahl der potentiell zur Eisenreduktion befähigten Bakterien im Oberboden maximal und nahm mit zunehmender Bodentiefe ab. Nur in dem S_d - und G_r -Horizont des Pseudogleys bzw. Gleyprofils fand erneut eine geringe Zunahme der Population an eisenreduzierenden Bakterien statt. Es handelte sich hierbei um eine mit der MPN-Methode ermittelten Keimzahl, weshalb eine Sicherung nach oben und unten durchgeführt wurde (Tab. 9).

Bei Betrachtung der Populationsdichte des S_d -Horizontes ($2,1 \times 10^5$ Keime / g Boden) im Vergleich mit dem Annahmehereich des überliegenden S_{w2} -Horizontes, wurde festgestellt, daß die ermittelte MPN noch innerhalb der zulässigen oberen Vertrauensschwelle liegt. Die Zunahme in der Population war demnach als nicht gesichert zu betrachten. Auch die relative Erhöhung der eisenreduzierenden Population (d.h. in % der bakteriellen Gesamtflora ermittelt mit Medium A und B) war infolgedessen zumindest in den unteren Abschnitten der Profile nicht gesichert. Entscheidend war jedoch die Erkenntnis, daß es in jedem Horizont eine große Anzahl Bakterien gibt, die potentiell zur Reduktion von Eisen(III)-Oxid befähigt sind.

Differenzierung der eisenreduzierenden Bakterien

Wie der Tab. 10 zu entnehmen ist, konnten unter den eisenreduzierenden Bakterien folgende Gruppen festgestellt werden:

1. Fakultativ anaerobe Sporenbildner (Bacillaceae);
2. Fakultativ anaerobe Vertreter der Coli-Aerobacter Gruppe (Lactose-verwertende Enterobacteriaceae);
3. Fakultativ anaerobe, organische schwefelmineralisierende Bakterien (s.Tab.11);

Tabelle 9

MPN der eisenreduzierenden Gesamtflora je g trock. Boden nach oben und unten gesichert mit einer Wahrscheinlichkeit $P = 0,95$. Anteil dieser Flora in % der bakteriellen Gesamtflora A (mittels Bodenextrakt-Glucose Agar) und B (mittels Glycerin-Pepton Agar).

	MPN	μ_u	μ_o	MPN in % A +)	von B +)
I. Pseudogley-Braunerde					
A _h	$9,9 \times 10^5$	$2,1 \times 10^5$	$46,3 \times 10^5$	1,8	2,7
B _v A _l	$1,2 \times 10^5$	$0,3 \times 10^5$	$5,6 \times 10^5$	1,1	1,6
S _w B _v	$5,4 \times 10^4$	$1,2 \times 10^4$	$2,5 \times 10^5$	0,8	3,4
S _w	$1,1 \times 10^4$	$0,2 \times 10^4$	$5,1 \times 10^4$	0,3	2,8
II. Pseudogley					
A _h 1	$40,7 \times 10^5$	$8,7 \times 10^5$	$19,1 \times 10^6$	5,0	7,4
A _h 2	$15,5 \times 10^5$	$3,3 \times 10^5$	$7,3 \times 10^6$	5,3	9,0
A _h 3	$14,0 \times 10^5$	$3,0 \times 10^5$	$6,6 \times 10^6$	10,2	11,9
S _w 1	$5,9 \times 10^5$	$1,3 \times 10^5$	$2,8 \times 10^6$	6,3	7,6
S _w 2	$1,2 \times 10^5$	$0,3 \times 10^5$	$5,6 \times 10^5$	1,9	3,0
S _d	$2,1 \times 10^5$	$0,5 \times 10^5$	$9,8 \times 10^5$	8,6	11,7
III. Gley					
A _h 1	$21,2 \times 10^5$	$4,5 \times 10^5$	$9,9 \times 10^6$	6,0	7,3
A _h 2	$12,2 \times 10^5$	$2,6 \times 10^5$	$5,7 \times 10^6$	11,3	11,9
A _h G _o	$1,3 \times 10^5$	$0,3 \times 10^5$	$5,6 \times 10^5$	9,3	6,3
G _o	$3,4 \times 10^4$	$0,7 \times 10^4$	$1,5 \times 10^5$	2,9	3,1
G _r	$2,0 \times 10^4$	$0,4 \times 10^4$	$9,4 \times 10^4$	3,2	3,9

+) Die Originalzahlen sind in Tab. 4 enthalten

4. obligat anaerobe, N₂-bindende Sporenbildner (Clostridium sp.);

5. obligat anaerobe, sulfatreduzierende Bakterien.

Alle diese Organismen waren in der Lage beim Wachstum einen Teil des zugesetzten Hämatits zu reduzieren und Ferroionen freizusetzen. Im allgemeinen waren sämtliche Bakteriengruppen zahlenmäßig am größten im Oberboden und nahmen

mit zunehmender Bodentiefe ab. Dabei traten jedoch einige Tendenzen hervor. Während die Gruppen der Bazillen und Enterobakterien gleichermaßen im A-Horizont der pseudovergleyten Braunerde vertreten waren, verschob sich dieses Verhältnis zu Gunsten der Bazillen im A-Horizont des feuchtigeren und humusreicheren Pseudogleys und Gley. In Prozenten ausgedrückt, erreichten die Enterobakterien ein Minimum in den Horizonten S_{wB_v} (Pseudogley-Braunerde), S_{w1} (Pseudogley) und A_{hG_o} (Gley), und stiegen in den wechselfeuchten S_{w2} (Pseudogley) und G_o (Gley) wieder an. Im Gegensatz zu den Enterobakterien nahm der Besatz an eisenreduzierenden Bazillen bis zur wasserführenden Zone ständig ab und stieg in dem G_r -Horizont und im S_d -Horizont über die Zahl der Enterobakterien hinaus. Ob diese Entwicklung auch gesichert war, schien weniger wichtig, da sie wahrscheinlich für jeden Boden anders sein wird. Bedeutungsvoller war jedoch die Summe der eisenreduzierenden Bazillen und Enterobakterien, die im Höchstfall beim B_{vA_1} -Horizont 98,3 % der eisenreduzierenden Gesamtpopulation betrug (s. Tab. 10). Demnach mußten außer den Bazillen und Enterobakterien noch andere, fakultativ anaerobe Bakterien zur Reduktion von Eisenoxid in der Lage sein, deren Population mit der Tiefe des Bodens ansteigt.

Zur Eisenreduktion kam es auch bei der Mineralisierung von organischen Schwefelverbindungen. In taxonomischer Hinsicht muß diese Gruppe von Organismen sehr heterogen sein, da sowohl Vertreter der Enterobakterien (Proteus sp., Escherichia sp.) als auch der Gattung Bacillus, Achromobacter, Pseudomonas und Clostridium zur Verwertung von organischen Schwefelverbindungen (hier Methionin) als einzige C-Quelle in der Lage sind (DE BARJAC und POCHON, 1955).

Die Verteilung der obligat anaeroben, eisenreduzierenden und stickstoffbindenden Clostridien zeigte deutlich in allen Profilen zwei Maxima: das erste im A-Horizont, das zweite stimmte jeweils überein mit den Zonen der Wechselfeuchte im Pseudogley- und Gleyprofil. Sowohl die "Molkenschicht" (A_{h2} -Horizont des Pseudogleys) als auch die periodische Oxydation-Reduktionszone bildete für die obligat anaeroben Bakterien ein ungünstiges Milieu. Dies ging auch aus dem Vorkommen der sulfatreduzierenden Bakterien hervor, deren Verteilung etwa parallel mit den eisenreduzierenden Clostridien verlief. Interessant war die Beobachtung, daß sowohl die Clostridien als auch die sulfatreduzierenden Bakterien im Vergleich zu den direkt darüber liegenden Zonen eine Zunahme im S_d - (Pseudogley) und G_r -Horizont aufwiesen. Diese Zunahme lag jedoch innerhalb der Annahmehereiche

Tabelle 10

Differenzierung und Verteilung von fakultativ- und obligat-anaeroben eisenreduzierenden Bakterien in verschiedenen vergleyten Böden. MPN je g trockenen Bodens.

	fakultativ anaerobe		obligat anaerobe	
	Enterobacteriaceae		Bacillaceae	
	MPN	% von Gesamtzahl(+)	MPN	% Gesamtzahl (+)
I. Pseudogley-Braunerde				
A _h	3,3 x 10 ⁵	33,3 %	3,3 x 10 ⁵	33,3 %
B _{A1}	3,1 x 10 ⁴	25,8 %	8,7 x 10 ⁴	72,5 %
S _{Bv}	5,2 x 10 ³	1,0 %	1,1 x 10 ⁴	21,2 %
S _w	2,4 x 10 ³	21,8 %	1,1 x 10 ³	10,0 %
II. Pseudogley				
A _h 1	9,8 x 10 ⁵	17,8 %	20,7 x 10 ⁵	50,9 %
A _h 2	5,9 x 10 ⁵	38,1 %	6,6 x 10 ⁵	42,6 %
A _h 3	5,9 x 10 ⁵	42,1 %	6,6 x 10 ⁵	47,1 %
S _w 1	3,3 x 10 ⁴	5,6 %	3,3 x 10 ⁵	55,9 %
S _w 2	1,8 x 10 ⁴	15,3 %	3,1 x 10 ⁴	25,8 %
S _d	5,5 x 10 ⁴	26,2 %	3,1 x 10 ⁴	14,8 %
III. Gley				
A _h 1	5,6 x 10 ⁵	26,4 %	10,0 x 10 ⁵	47,2 %
A _h 2	7,3 x 10 ⁴	6,0 %	7,3 x 10 ⁵	59,8 %
A _h 3	1,2 x 10 ³	1,0 %	3,2 x 10 ⁴	26,7 %
G _o	12,6 x 10 ³	38,2 %	6,0 x 10 ³	18,2 %
G _r	6,0 x 10 ²	3,0 %	3,3 x 10 ³	16,5 %
N ² -bind. Clostridien				
sulfured. Bakt.				
	MPN		MPN	
		</		

+) Die Gesamtzahl der Fe₂O₃-reduzierenden Population (MPN) ist in Tab. 9 angegeben.

Tabelle 11

Anteil der Gas- und Säurebildner an der eisenreduzierenden Gesamtpopulation einiger Bakteriengruppen. Populationsdichte in MPN je g trock. Boden

	Enterobacterien		Bazillen		davon	
	Gesamtzahl	Gasbildner	Gesamtzahl	Säurebildner	Gasbildner	Säurebildner
I. Pseudogley-Braunerde						
A _h	$3,3 \times 10^5$	$5,9 \times 10^5$	$3,3 \times 10^5$	$5,9 \times 10^5$	$3,3 \times 10^4$	$1,3 \times 10^5$
B _{V1}	$3,1 \times 10^4$	$1,9 \times 10^4$	$8,7 \times 10^4$	$3,1 \times 10^5$	$3,1 \times 10^3$	$5,6 \times 10^4$
S _B	$5,2 \times 10^3$	$2,9 \times 10^3$	$1,1 \times 10^4$	$2,9 \times 10^4$	$2,3 \times 10^2$	$1,1 \times 10^4$
S _w	$2,4 \times 10^3$	$5,5 \times 10^2$	$1,1 \times 10^3$	$5,4 \times 10^4$	$1,1 \times 10^2$	$1,8 \times 10^4$
II. Pseudogley						
A _h 1	$9,8 \times 10^4$	$2,1 \times 10^4$	$20,7 \times 10^5$	$2,1 \times 10^5$	$9,8 \times 10^4$	$20,7 \times 10^5$
A _h 2	$5,9 \times 10^5$	$6,6 \times 10^4$	$6,6 \times 10^5$	$5,9 \times 10^5$	$6,6 \times 10^4$	$1,4 \times 10^5$
A _h 3	$5,9 \times 10^5$	$1,1 \times 10^5$	$6,6 \times 10^5$	$6,6 \times 10^6$	$6,6 \times 10^4$	$6,6 \times 10^5$
S _w 1	$3,3 \times 10^4$	$1,3 \times 10^4$	$3,3 \times 10^5$	$5,9 \times 10^5$	$5,9 \times 10^3$	$2,0 \times 10^4$
S _w 2	$1,8 \times 10^4$	$1,2 \times 10^4$	$3,1 \times 10^4$	$3,0 \times 10^5$	$5,5 \times 10^3$	$5,5 \times 10^4$
S _d	$5,5 \times 10^4$	$4,9 \times 10^3$	$3,1 \times 10^4$	$5,5 \times 10^5$	$5,5 \times 10^4$	$5,5 \times 10^4$
III. Gley						
A _h 1	$5,6 \times 10^5$	$4,5 \times 10^4$	$10,0 \times 10^5$	$5,6 \times 10^5$	$3,3 \times 10^4$	$10,0 \times 10^5$
A _h 2	$7,3 \times 10^4$	$2,4 \times 10^4$	$7,3 \times 10^5$	$1,5 \times 10^5$	$3,3 \times 10^3$	$24,4 \times 10^5$
A _h G _o	$1,2 \times 10^3$	$1,9 \times 10^3$	$3,2 \times 10^4$	$3,2 \times 10^4$	$5,8 \times 10^3$	$3,2 \times 10^4$
G _o	$1,3 \times 10^4$	$2,0 \times 10^3$	$6,0 \times 10^3$	$6,0 \times 10^3$	$1,3 \times 10^3$	$6,0 \times 10^3$
G _r	$6,0 \times 10^2$	$1,5 \times 10^4$	$3,3 \times 10^3$	$3,3 \times 10^3$	$6,0 \times 10^1$	$3,3 \times 10^3$

Tabelle 11 (Forts. v. S. 65)

	N ₂ -bindende Gesamtzahl	Clostridien davon Gasbildner	S-mineralisierende Gesamtzahl	Bakt. davon H ₂ (S ⁺)-Bildner
I. Pseudogley-Braunerde				
A _h	5,9 x 10 ⁴	3,3 x 10 ³	5,9 x 10 ⁵	5,3 x 10 ²
B _{A1}	1,9 x 10 ³	5,6 x 10 ²	5,6 x 10 ⁴	2,5 x 10 ²
S _{Bv}	2,9 x 10 ³	2,9 x 10 ³	2,9 x 10 ³	8,7 x 10 ¹
S _w	1,1 x 10 ²	2,4 x 10 ²	5,3 x 10 ¹	3,0 x 10 ¹
II. Pseudogley				
A _{h1}	2,1 x 10 ⁴	9,8 x 10 ⁴	6,5 x 10 ⁴	1,6 x 10 ³
A _{h2}	3,0 x 10 ³	6,6 x 10 ³	1,4 x 10 ⁴	6,6 x 10 ²
A _{h3}	6,6 x 10 ³	1,4 x 10 ³	6,0 x 10 ⁵	3,7 x 10 ¹
S _{w1}	5,9 x 10 ³	3,3 x 10 ³	9,8 x 10 ²	2,8 x 10 ²
S _{w2}	9,2 x 10 ²	2,5 x 10 ²	1,8 x 10 ⁴	5,5 x 10 ¹
S _d	3,1 x 10 ³	1,2 x 10 ³	3,1 x 10 ³	9,2 x 10 ¹
III. Gley				
A _{h1}	2,1 x 10 ⁴	2,1 x 10 ⁴	2,1 x 10 ⁴	4,5 x 10 ³
A _{h2}	4,1 x 10 ⁴	1,6 x 10 ⁴	7,3 x 10 ⁴	1,2 x 10 ³
A _{hO}	9,3 x 10 ³	5,8 x 10 ³	3,2 x 10 ²	3,2 x 10 ¹
G _O	1,3 x 10 ³	1,3 x 10 ³	1,3 x 10 ³	2,7 x 10 ²
G _r	3,3 x 10 ³	6,0 x 10 ²	6,0 x 10 ¹	9,9 x 10 ¹

+) Beim Auswerten wurde angenommen, das FeS (schwarz) infolge H₂S Entwicklung entstand

der MPN dieser Organismengruppen, bei einer Vertrauenswahrscheinlichkeit von 95 %, und der Anstieg war somit nicht signifikant.

3. Beziehung zwischen Eisenreduktion, Säurebildung und Gasentwicklung

Bei der Ermittlung der MPN der eisenreduzierenden Populationen wurde deren gasbildende bzw. säurebildende Fraktion gemeinsam erfaßt (s. Tab. 11). Aus dem Vergleich dieser drei Populationen sind folgende Tendenzen zu erkennen:

1. Die Säurebildner unter den Enterobakterien sind wesentlich zahlreicher als deren eisenreduzierende Gesamtpopulation, dagegen sind die Gasbildner deutlich geringer als die eisenreduzierende Fraktion.
2. Unter den eisenreduzierenden Bazillen ist die gasbildende Population kleiner, die säurebildende Population gleich oder etwas größer.
3. Die Anzahl der eisenreduzierender, N_2 -fixierender Clostridien (bestimmt nach Rotfärbung mit α, α' -Dipyridylreagenz) ist größer als ihre gasentwickelnde Population (bestimmt durch Auswertung der gasführenden Durhamröhrchen).
4. Die totale, eisenreduzierende Fraktion (Rotfärbung mit α, α' -Dipyridylreagenz) der organischen schwefelmineralisierenden Population ist wesentlich größer als ihre H_2S -produzierende Anzahl (gemessen an der FeS -Bildung).

Demnach scheint keine Beziehung zwischen Säurebildung und Gasentwicklung (CO_2 , H_2 und/oder H_2S) einerseits und Eisenreduktion andererseits zu bestehen. In Bezug auf die Physiologie der Eisenreduktion durch Bakterien kann man folgern, daß es unter den eisenreduzierenden Enterobakterien, Bazillen und Clostridien Vertreter dieser Gruppen gibt, die kein Gas in nachweisbaren Mengen bilden, oder, vice versa, die Anwesenheit von Eisenoxid (Fe_2O_3) verändert den Stoffwechselmechanismus so, daß es zu einer verringerten Gasproduktion kommt. Eine solche hemmende Wirkung auf die Bildung von Wasserstoff wurde bereits nach Zugabe von Nitrat zum Boden festgestellt (LASKOWSKI und MORAGHON, 1967), während ALEXANDER (1964) berichtet, daß durch Zugabe von Nitrat zum überfluteten Reisboden die Reduktion von Eisenoxid vorübergehend unterbunden werden konnte.

4. Eisenreduktion und dissimilatorische Nitratreduktion

In Abb. 6 wurde die Entwicklung der Säure- und Gasproduktion, sowie der dissimilatorischen Nitrat- und Eisenreduktion dargestellt, und zwar in einer Funktion der Zeit und der mittleren, aktiven Grenzpopulation (Dm). Die Aktivitätskurven beziehen sich auf den G_r -Horizont des Gleyprofils. Für den S_w -Horizont der Pseudogley-Braunerde und für den S_d -Horizont des Pseudogleys wurden ähnliche Entwicklungen beobachtet (OTTOW, 1969).

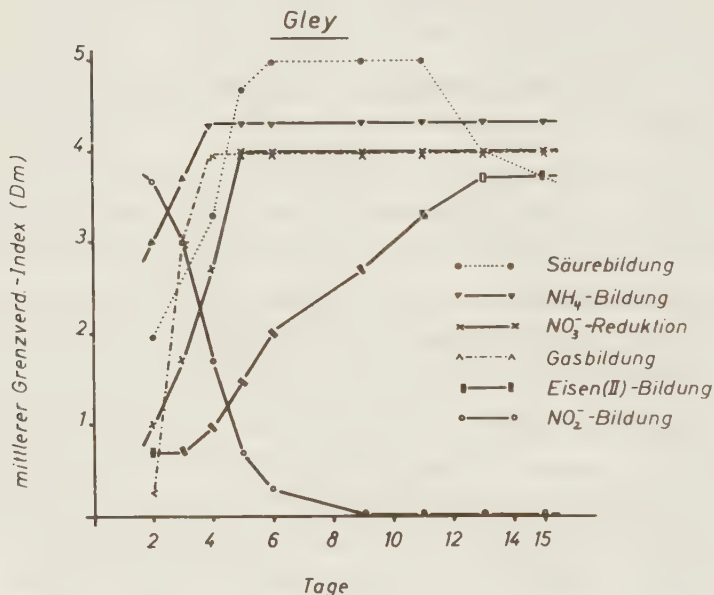


Abb. 6: Verlauf der Aktivitätskurven für dissimilatorische Nitratreduktion, Säureproduktion, Gasentwicklung und Eisenreduktion eines G_r -Horizontes (Gley)

Die Nitratreduktion stieg zunächst rasch an, erreichte aber schon nach 5 Tagen ihr Maximum. Die Kurve zeigt das Verschwinden des Nitrations an. Die Nitritproduktion verlief etwa im umgekehrten Sinne. Schon nach 7 Tagen war der wesentliche Teil in Ammoniak überführt. Die Bildung des Eisen(II)-Ions blieb zunächst

schwach, stieg aber nach Erschöpfung der NO_3^- - bzw. NO_2^- -Konzentration stärker an und erreichte nach etwa 13 bis 14 Tagen ihre maximale Höhe. Die Größe der eisenreduzierenden Population lag dabei etwa unter der dissimilatorischen nitrat-reduzierenden Flora. In Abb. 5 war jedoch im G_r -Horizont die Zahl der eisen-reduzierenden Bakterien etwas größer als die der nitratreduzierenden Flora. Man könnte hier vermuten, daß in Anwesenheit des Nitrates nicht mehr alle potentiell zur Eisenreduktion befähigten Bakterien diesen Vorgang durchzuführen vermochten.

Aus dem Verlauf der Säureproduktion ist zu entnehmen, daß nach etwa 11 Tagen ein Teil der gebildeten organischen Säuren als C-Quelle weiter verwertet wurden. Erkennbar war dieser Prozeß am Umschlag des Bromthymolblau-Indikators von Gelb nach grün-blau in einem Teil der Röhrchen. Im Bezug auf den Vorgang der Eisenreduktion kann abschließend vermutet werden, daß 1. die Reduktion der Eisenoxide mit dem Stoffwechsel bestimmter Bakterien direkt verbunden ist, und 2. Nitrat- bzw. Nitritreduktion und die Reduktion von Eisen(III)-Oxiden gleich-artige, aber alternative Prozesse sind.

4.3. Qualitative mikrobiologische Untersuchungen:

Diagnostik der isolierten, eisenreduzierenden Bakterien aus
vergleyten bzw. pseudovergleyten Bodenzonen

Nach Erhaltung der Reinkulturen wurden die isolierten Stämme (insgesamt 163) auf ihre eisenreduzierende Kapazität geprüft und die positiven Organismen weiter makroskopisch, mikroskopisch und physiologisch untersucht. Die Herkunft der eisenreduzierenden Stämme ist zahlenmäßig in Tab. 12 aufgeführt.

Tabelle 12

Herkunft und Zahl der isolierten, eisenreduzierenden Stämme aus Bodenzonen
hydromorpher Böden

Horizont	Bodenextrakt-Glucose Agar (Medium A)	Glycerin-Pepton Agar (Medium B)
S_w (Pseudogley-Braunerde)	5	2
S_d (Pseudogley)	16	15
G_r (Gley)	15	18

Anhand der Gram-Färbung sowie mikroskopischen Untersuchungen konnte festgestellt werden, daß es sich um Gram-negative und Gram-positive (bis Gram-variable) Stäbchen handelte. Die Größe der Gram-negativen Stäbchen variierte stark. Neben typischen Stäbchen (0,5 bis 0,7 Mikron breit und 1,0 bis 4,0 Mikron lang), kamen wiederholt Kurzstäbchen und kokkenartige Formen in den gleichen Kulturen vor. Die Zellen erschienen allein, in Paaren oder kurzen Ketten, und enthielten vielfach violett gefärbte Pole ähnlich den sog. Polkörperchen der Corynebakterien.

Sämtliche Gram-positiven Bakterien bildeten Endosporen und zeigten zum Teil Kettenbildung oder Fäden.

Biochemische Differenzierung nach dem O/F-Test

Der O/F-Test (oxidativer versus fermentativer Abbau von Kohlenhydraten) nach HUGH und LEIFSON (1953) eignet sich gut zur globalen Gruppenklassifizierung unbekannter Stämme. Bakterien mit einem oxidativen Stoffwechsel bilden in dem festen Medium von HUGH und LEIFSON nur in den offenen Röhrchen Säuren, während die zur Fermentation befähigten Organismen auch in den mit Paraffin verschlossenen (anaerob) Parallelen eine Gelbfärbung hervorrufen. Die Gram-positiven Organismen waren O/F = +/+, die Gram-negativen Stäbchen erschienen O/F = +/- . Eine Ausnahme bildeten die Stämme AGr 23 und AGr 24, die sowohl oxidativ als auch fermentativ negativ waren (im Bezug auf Glucose und Lactose nach 7-tägiger Bebrütungsdauer). Nach der Interpretation von HUGH und LEIFSON (1953) gehören zu den Gram-negativen Bakterien, die O/F = +/- sind, die Pseudomonaden und die Arten der Gattung Agrobacterium, während die O/F = -/- Organismen vielfach der Gruppe Alcaligenes-Flavobacterium zugeordnet werden können.

1. Differenzierung und Identifizierung der Gram-negativen Bakterien der Gruppe O/F = +/-

Die Pseudomonaden unterscheiden sich von der Gattung Agrobacterium durch ihre Fähigkeit wasserlösliche Pigmente zu bilden. Die Pigmentbildung bei den Arten von Pseudomonas ist jedoch eine variable Eigenschaft, die leicht verloren gehen kann (vgl. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 1957), oder erst unter bestimmten Nährstoff- und Milieubedingungen (pH) zu beobachten ist (RUSCHKE und KÖHN, 1968). Da diese Farbstoffbildung ein charakteristisches Merkmal ist,

wurde sie mehrfach geprüft, und zwar in der Nährlösung von ELLIOT (1958) zum Nachweis von wasserlöslichen Fluoreszinen, sowie im Medium A von KING, WARD und RANEY (1954) zur Diagnostik von gelbgrünen Pigmenten, und im Medium B zur Prüfung von blau-grünen Pyocyaninen oder braunen Pyorubrinen. Mit Ausnahme von 2 Stämmen kamen alle Organismen der Gruppe O/F = +/- in mindestens einem dieser Medien zur typischen Pigmentbildung.

Beschreibung und Klassifizierung der Stämme in der Gruppe O/F = +/-

1. Pseudomonas denitrificans (20 Stämme)

Morphologie

a. makroskopisch: Runde, meist große Einzelkolonien, erhaben bis konvex, glattrandig und glänzend, mit Tendenz zur starken Rasenbildung. Ausbreitung auf der Platte (Nähragar) durch typische gelapprtrandige, bis fingerförmige Ausläufer (s. Abb. 7). Konsistenz schleimig und durchscheinend.

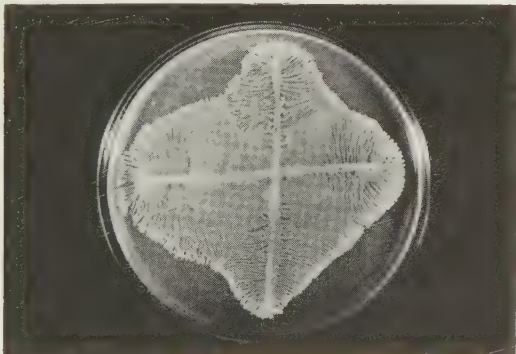


Abb. 7: Typische Rasenbildung mit fingerförmigen Ausläufern von Pseudomonas denitrificans auf Gelatine-Nähragar. Koagulation mit Frazier's Entwickler

b. mikroskopisch: Gram-negativ, unterschiedlich lange Stäbchen, vielfach kokkenartige Formen. Größe der Stäbchen etwa 0,6 bis 1,0 Mikron lang. Zellen einzeln oder in Paaren, meist mit zwei charakteristischen, violetten, terminalen Polkörperchen je Zelle, ausnahmslos begeißelt.

Physiologische Leistungen

Begeißelt; Gelatinase negativ (Stichkultur und Frazier's Reaktion); Fluoreszinbildung in Elliot's Medium positiv; Pigmentbildung in King's Medium A und B positiv; Nitrat reduziert zu gasförmigem Stickstoff (aerob und anaerob); Lecithinase negativ; Säure aus Glucose; nicht vergoren wurden dagegen Sucrose, Mannit, Arabinose, Maltose, Rhamnose, Inosit, Galactose und Lactose. Stärkehydrolyse negativ; in Lackmusmilch Alkalisierung und Reduktion (vielfach), aber keine Eiweißgerinnung; Indolbildung negativ; Methylrot Reaktion negativ; Acethyl-Methyl-Carbinol (Voges-Proskauer Reaktion) positiv; Säurebildung in Ammonium-Glucose Nährlösung; kein Wachstum in 10 % NaCl-Bouillon; Säurebildung ohne Schaum in Glucose-Asparagin-KNO₃-Nährlösung; Katalase und Oxidase positiv; H₂S-Bildung negativ;

Wachstumstemperaturen bei 25° C: sehr gutes Wachstum nach 48 Std.

30° C: gutes Wachstum nach 48 Std.

37° C: kein Wachstum

42° C: kein Wachstum.

Als Pseudomonas denitrificans wurde klassifiziert mit nur geringfügigen Abweichungen die Stämme:

ASd 1, 2, 6, 9 und 11; BSd 1, 2, 8, 10, 11, 12, 13, 22, und 24;

AGr 1 und 14.

BSd 6, 7, 17 und 18 oxidieren außer Glucose auch noch Arabinose, Galactose, und Inosit (schwach). Das Wachstumsoptimum lag jedoch bei 25° C, was unter den denitrifizierenden Pseudomonaden typisch für Ps. denitrificans ist.

2. Pseudomonas stutzeri (8 Stämme)

Morphologie

a. makroskopisch: nicht von Ps. denitrificans zu unterscheiden.

b. mikroskopisch: kleiner als Ps. denitrificans, viele kokkenartige Formen, begeißelt.

Physiologische Leistungen

Pseudomonas stutzeri und Ps. denitrificans sind in ihren wichtigsten biochemischen Merkmalen identisch (begeißelt, denitrifizierend und Gelatinase-negativ).

Mit Nitrat im Medium zeigt Ps. stutzeri jedoch typische Schaumbildung sowie eine Alkalisierung (Blaufärbung). Letztere beruht darauf, daß Ps. stutzeri im Gegensatz zu Ps. denitrificans, unter den Kohlenhydraten nur Glucose (schwach) zu oxidieren vermag, wodurch die Alkalisierung die Säurebildung übertrifft. Ein weiterer, charakteristischer Unterschied liegt bei der optimalen Wachstumstemperatur, die für Ps. stutzeri bei 35° C und für Ps. denitrificans bei 25° C liegt. Aufgrund der ersten beiden Eigenschaften, die gut erkennbar waren im Glucose-Asparagin-KNO₃-Nährsubstrat, wurden nachfolgende denitrifizierende Pseudomonaden als Ps. stutzeri klassifiziert:

ASd 3 und 4; BSd 19 und 20; AGr 19, 20, 21. 22.

Die Größe der Zellen wurde nicht als Differenzierungsmerkmal herangezogen, da sie stark vom Milieu abhängig ist.

3. Intermediäre Form Pseudomonas denitrificans-stutzeri

Stamm AGr 29 zeigte wie Ps. denitrificans ein deutliches Wachstumsoptimum von 25° C, andererseits aber eine schwache Säurebildung von Glucose, wie dies von Ps. stutzeri bekannt ist. Ihre morphologische Erscheinung nach (Nähragar) war sie als ein typischer Ps. denitrificans zu betrachten, da während der Rasenbildung die typischen fingerförmigen Ausläufer zu beobachten waren. Im Gegensatz zu Ps. denitrificans und Ps. stutzeri war dieser Stamm unbegeißelt, auch nach mehrfacher Prüfung. Unbegeißelte Pseudomonaden sind jedoch sehr selten. Das Fehlen der Motilität wurde nur unter 6 der 149 von BERGEY beschriebenen Arten beobachtet, darunter war jedoch keine einzige denitrifizierende (aerob und anaerob) Form.

4. Pigmentlose Pseudomonas sp. (2)

Morphologie

a. makroskopisch: Mittelgroße, runde Einzelkolonien, undurchsichtig, konvex, glattrandig, grob granuliert.

b. mikroskopisch: wie Pseudomonas denitrificans.

Physiologische Leistungen

Die Stämme BGr 19 und 21 unterschieden sich in ihren biochemischen Leistungen

nicht von Ps. denitrificans, ausgenommen vom Fehlen der Pigmentbildung in Elliot's und King's Medien. BGr 19 war denitrifizierend (aerob und anaerob), BGr 21 dagegen nur nitratreduzierend. Außer Glucose wurden keine Kohlenhydrate verwertet, was auf Ps. denitrificans hindeutet. Die optimale Wachstumstemperatur für den Stamm BGr 19 betrug 25° C, und wäre demnach als eine pigmentlose Form von Ps. denitrificans zu klassifizieren.

Der Stamm BGr 21 zeigte gutes Wachstum im Temperaturbereich 25° bis 35° C und wäre möglicherweise als ein pigmentloser Stamm von Ps. desmolytica zu betrachten.

5. Pseudomonas fluorescens-putida (5 Stämme)

Morphologie

a. makroskopisch: ähnlich Ps. denitrificans

b. mikroskopisch: Kurz- und Langstäbchen, jedoch keine kokkenartige Formen; Größe 0,3 bis 0,6 zu 0,9 bis 1,5 Mikron.

Physiologische Leistungen

Die Stämme ASd 7 und 8 ließen sich verhältnismäßig schwierig einordnen. In ihren physiologischen Leistungen unterschieden sie sich von Ps. denitrificans nur aufgrund des Fehlens der denitrifizierenden Fähigkeit. Nitrat wurde nur bis zu Nitrit reduziert. Beide Stämme waren begeißelt, wuchsen gut bei 25° C und 35° C, bildeten Säure aus Glucose, aber nicht aus Sucrose, Mannit, Arabinose, Maltose, Rhamnose, Inosit, Galactose und Lactose. ASd 7 war gelatinase-negativ, ASd 8 dagegen positiv. Im wesentlichen stimmten ihre Merkmale mit denen von Ps. putida (gelatinasenegativ) und Ps. fluorescens (gelatinasepositiv) überein. Die Spezies putida und fluorescens unterscheiden sich nur in der Verflüssigung von Gelatine, und werden von BERGEY als wahrscheinlich identisch angegeben. Nach KLINGE (1959) unterscheidet sich jedoch Ps. fluorescens weiter von Ps. putida aufgrund der Eigelbreaktion (Trübung des Eigelbagars), welche für Ps. fluorescens positiv ist. Stamm ASd 8 stimmte auch in dieser Hinsicht mit Ps. fluorescens überein, während ASd 7 Lecithinase negativ war. KLINGE fordert aber aufgrund seiner Untersuchungen an 27 Ps. fluorescens Stämmen zur Einordnung in die Gruppe Ps. fluorescens-putida die Fähigkeit zum oxidativen Abbau mehrerer Koh-

lenhydrate, darunter Glucose, Arabinose, Galactose, Rhamnose und Inosit mit der Bildung von Säuren. Diese Säurebildung konnte sowohl bei Asd 7 als auch 8 nur bei Glucose festgestellt werden. Eine auf Glucose beschränkte Verwertung von Kohlenhydraten ist jedoch charakteristisch für Ps. denitrificans und Ps. stutzeri, die aber beide zur Denitrifikation befähigt sind (BERGEY, 1957). Auch nach Überprüfung blieben Asd 7 und 8 sowohl in neutralem als auch in alkalischer 0,1 % KNO_3 -Bouillon nur zur Nitratreduktion befähigt. Während KLINGE (1959) ein 1 %iges Kohlenhydrat-Pepton Medium verwendete, wurde die Säurebildung hier in einem 0,5 %igen Kohlenhydrat-Pepton Medium geprüft. Es wäre möglich, daß in dem verwendeten Medium die Säureproduktion durch die alkalischen Spaltprodukte verdeckt wurde.

Die Stämme BGr 1 und AGr 27, sowie Asd 11 unterschieden sich von allen anderen pigmentbildenden, nichtsporenbildenden, beweglichen Stäbchen aufgrund ihrer negativen Nitratreduktion. Alle 3 sind Gelatinase negativ, wachsen gut bei 35° C und bilden Säure aus Glucose (schwach), Mannit (schwach), Arabinose, Rhamnose, Galactose und Inosit. Die ausgeprägten oxidativen Fähigkeiten ordnen diese Stämme in die Gruppe Ps. putida ein, unterscheiden sich jedoch von diesem Organismus aufgrund des Fehlens des Enzyms Nitrat-Reduktase. Die fehlende Nitratreduktion bei den Vertretern der Gruppe Pseudomonas fluorescens-putida wurde neuerdings auch von RUSCHKE (1968) festgestellt. Obwohl er unter 95 Pseudomonas fluorescens Stämmen lediglich 16 nitratreduzierende feststellte, hält er diese von BERGEY's (1957) Definition abweichenden Befunde für unzureichend um die Existenz verschiedener Keimarten anzuerkennen.

6. Pseudomonas aeruginosa-denitrificans? (BGr 8)

Morphologie

- a. makroskopisch: Mittelgroße Einzelkolonien, glattrandig bis wellig, flach bis konvex, schleimig und glänzend. Ältere Kulturen (3-4 Tage auf Nähragar) umgeben sich mit grünlich-gelbem Hof und zeigen Tendenzen zur Rasenbildung.
- b. mikroskopisch: Gram-negative Stäbchen, Größe 0,6 zu 1,7 Mikron; auch kurze und kokkenartige Formen, begeißelt.

Physiologische Leistungen

Gelatinase positiv (Stichkultur und Frazier's Reaktion), Nitrat wird zu gasförmig-

gem Stickstoff reduziert (aerob und anaerob); Elliot's Medium blieb negativ; King's Medium A, wurde bläulich gefärbt, King's Medium B, bräunlich; Säurebildung aus Glucose, aber nicht aus den übrigen Kohlenhydraten; in Lackmusmilch Alkalisierung und Reduktion; MR-VP-Reaktion negativ; Stärkehydrolyse negativ; Citratverwertung negativ; Oxidase negativ; Katalase positiv. H_2S -Bildung negativ.

Wachstumstemperaturen bei $25^{\circ}C$: langsames Wachstum in 24 Std.

$30^{\circ}C$: gutes Wachstum

$37^{\circ}C$: sehr gutes Wachstum nach 24 Std.

$42^{\circ}C$: mäßiges Wachstum nach 24 Std.

Aufgrund der höheren Temperaturansprüche (Optimum bei $30 - 37^{\circ}C$) dürfte dieser Stamm eine intermediäre Stellung zwischen den Arten Ps. denitrificans und Ps. aeruginosa einnehmen.

7. Pseudomonas desmolytica-putida (BGr 23)

Morphologie

a. makroskopisch: Mittelgroße, runde Einzelkolonien, Rand glatt bis wellenförmig, Kolonie konvex bis erhaben, Zentrum weißlich-braun, Randpartie durchsichtig, glänzend.

b. mikroskopisch: Gram-negative, variable Stäbchen, 0,6 bis 0,8 zu 1,0 bis 2,0 Mikron; kokkenartige Formen vorhanden; 2 charakteristische violette Polkörperchen je Zelle, unbegeißelt.

Physiologische Leistungen

Gelatinase negativ (Stichkultur); Frazier's Reaktion positiv; Fluoreszinbildung in Elliot's Medium positiv; Pigmentbildung in King's Medium A und B positiv; Nitrat aus Nitrit (aerob und anaerob); Lecithinase negativ; Säurebildung aus Glucose, Arabinose und Rhamnose, aber nicht aus Sucrose, Mannit, Maltose, Inosit, Galactose und Lactose; Stärkehydrolyse negativ; in Lackmusmilch Alkalisierung und Reduktion; Indolbildung negativ; MR-VP-Reaktion negativ; Säurebildung in Ammonium-Glucose Nährlösung positiv; kein Wachstum in 10 % NaCl-Bouillon; Katalase positiv; Oxidase negativ.

Wachstumstemperatur bei $25^{\circ}C$: gutes Wachstum nach 28 Std.

$30^{\circ}C$: sehr gutes Wachstum nach 24 Std.

37° C: gutes Wachstum nach 48 Std.

42° C: mäßiges Wachstum nach 48 Std.

Diese biochemischen Leistungen stimmen gut überein mit BERGEY's Ps. desmolytica. Das Temperaturoptimum lag jedoch bei 30° bis 37° C; außer Glucose wurden auch Arabinose und Rhamnose oxidativ verwertet. Demnach tendiert dieser Organismus zur Gruppe Ps. putida, unterscheidet sich aber von ihm aufgrund der höheren Temperaturansprüche.

Die Variabilität in der Gattung Pseudomonas

Unter den 149 beschriebenen Spezies der Gattung Pseudomonas in BERGEY's Manual of Determinative Bacteriology (1957), werden über 90 Pseudomonas Arten genannt, die wasserlösliche, überwiegend grünliche fluoreszierende Pigmente ausscheiden. Die meisten der aufgeführten Spezies sind mit so wenig Merkmalen charakterisiert, daß vermutlich mehrere Spezies eine eingehende Überprüfung nicht bestehen könnten. Dazu kommt noch, daß die Pseudomonaden anscheinend über eine besondere Anpassungsfähigkeit verfügen, die sich in der großen Variabilität der "Arten" äußert. So fand KLINGE (1959) bei allen 27 Ps. fluorescens Stämmen die Fähigkeit zur Nitratreduktion, während RUSCHKE (1968) unter 95 solcher Stämme nur 16 mit einer positiven Nitratreduktion feststellte. Die Variabilität der Eigenschaften ist erheblich. So fand KLINGE (1959), im Gegensatz zu den Angaben von BERGEY, nach denen Ps. fluorescens Lackmusmilch nur alkalisieren soll, auch noch Stämme, die in Lackmusmilch Säurebildung und Gerinnung zeigten. Während weiter die Hämolyse auf Hammelblutplatten als typisch für Ps. aeruginosa gilt, gibt es unter Ps. fluorescens sowohl positive als auch negative Formen. Auch bei den vorliegenden Untersuchungen wurde die Variabilität innerhalb einer Art bei der Säurebildung aus Zuckerarten, sowie in der Motilität und Fähigkeit zur Nitratreduktion bestätigt. Gerade beim Genus Pseudomonas scheinen Differenzierung und Diagnostik der Spezies infolge der Variabilität der Reaktionsnormen und physiologischen Leistungen sowie der unvollständigen Angaben in BERGEY's Manual of Determinative Bacteriology (1957) gewagt.

2. Differenzierung und Identifizierung der eisenreduzierenden Bazillen

Die Gram-positiven, O/F = +/+, aerob sporulierenden Stäbchen wurden nach dem Schema von WOLF und BARKER (1968) weiter differenziert. Diese Klassifizierung stellt eine rezente Ergänzung der Einordnungsprinzipien von SMITH, GORDON und CLARK (1952) dar, Kriterien die auch in BERGEY's Manual (1957) zur Systematik herangezogen wurden. Die Vertreter der Gattung Bacillus unterscheiden sich stark in ihren fermentativen Fähigkeiten, dagegen nur geringfügig in der Morphologie. Große Bedeutung unter den morphologischen Merkmalen kommen Durchmesser, Bildungsart und Anordnung der Sporen zu. Bei 14 der 25

aufgeführten Arten von Bacillus in BERGEY's Manual blähen sich die Sporen stark auf, während die übrigen Arten dieses Merkmal nicht aufweisen. KRASSILNIKOV (1959) rechnet sogar nur Vertreter der ersten Gruppe zu der Gattung Bacillus, und klassifiziert die anderen aeroben Sporenbildner zu der Gattung Clostridium. Nach den neuesten Ansichten von WOLF und BARKER (1968) sind die aeroben Sporenbildner aufgrund der Sporenform und ihrer Bildungsweise in 3 Gruppen einzuteilen: in der Gruppe I ist die Spore oval bis zylindrisch und dünnwandig, ihr Durchmesser ist nie breiter als die vegetative Zelle. In der Gruppe II ist die Spore oval und dickwandig sowie breiter als die vegetative Zelle und in der Gruppe III ist die Spore kugelig und die vegetativen Formen haben deutlich komplexe ernährungsphysiologische Ansprüche. Die isolierten, eisenreduzierenden Bazillen zeigten alle Formen, bei der die Sporen im jungen Stadium (nach 24 Std. auf Nähragar, 30°) sowie in alten Kulturen (nach einer Woche, Nähragar 30°) in der Regel nicht breiter oder höchstens annähernd so breit waren wie die vegetativen Zellen. Die Sporen waren oval oder eckig-zylindrisch; die Zellen meist in Paaren, Ketten oder in langen, schmalen Fäden (B. subtilis) angeordnet. Diese Charakteristika deuteten auf Zugehörigkeit zur Gruppe I hin.

1. Gruppe Bacillus cereus (6 Stämme)

Morphologie

a. makroskopisch: Einzelkolonien groß, mit Tendenz zur Rasenbildung, undurchsichtig, weiß und nabelförmig.

b. mikroskopisch: Gram-positive, kurze eckige Stäbchen, meist paarweise zu Ketten oder Fäden vereinigt. Spore oval bis zylindrisch, manchmal eckig, zentral und in der Regel nicht aufgebläht; begeißelte und unbegeißelte Formen, etwa 1,0 zu 3,0 Mikron (Nähragar)

Physiologische Leistungen

Säurebildung in synthetischer Ammonium-Glucose Nährlösung; Gelatinase positiv; (Stichkultur) Frazier's Reaktion positiv; Lecithinase positiv; Citratverwertung positiv; MR-VP-Reaktion positiv; Indolbildung positiv; Stärkehydrolyse positiv; gutes Wachstum auf Glucose-Schrägar; kein Wachstum in 10 % NaCl-Bouillon; Nitrit

aus Nitrat (aerob und anaerob); Glucose, Sucrose (schwach), Arabinose, Maltose wurden ohne Gasbildung vergoren, aber nicht Rhamnose, Inosit, Galactose, Mannit und Lactose. Katalase positiv; Oxidase negativ; anaerogene Säurebildung, aber keine H_2S -Bildung in Eisen-Drei-Zucker-Agar (TSI-Agar); in Lackmusmilch Gerinnung und Reduktion.

Wachstumstemperaturen bei $25^{\circ}C$: gutes Wachstum nach 24 Std.

$30^{\circ}C$: sehr gutes Wachstum nach 24 Std.

$37^{\circ}C$: gutes Wachstum nach 48 Std.

$42^{\circ}C$: mäßiges Wachstum nach 48 Std.

Als Bacillus cereus wurde identifiziert: ASw 12, ASw 14 (begeißelt), ASw 16, BGr 5 (jedoch Citrat negativ, Sucrose negativ, Maltose negativ), AGr 30 und BGr 4b.

2. Gruppe Bacillus cereus var. mycoides (14 Stämme)

Morphologie

a. makroskopisch: myzelartige, flache, stark kriechende Kolonien mit unechten Verzweigungen, meist links drehend.

b. mikroskopisch: Zellen etwa 0,8 bis 1,4 Mikron dick (Nähragar, 25°), Spore oval und zentral bis exzentrisch. Sporen gelegentlich leicht aufgebläht, meist kurze Stäbchen, einzeln oder paarweise zu langen Ketten vereint, begeißelt.

Physiologische Leistungen

Kein Wachstum in Ammonium-Glucose Nährlösung; Gelatinase positiv; Lecithinase negativ; Citratverwertung negativ; MR-VP-Reaktion positiv; Stärkehydrolyse positiv; sehr gutes Wachstum auf Glucose-Schrägagar; kein Wachstum in 10 % NaCl-Bouillon; Nitrit aus Nitrat (aerob und anaerob); Glucose, Sucrose, Mannit, Maltose werden anaerogen vergoren, Arabinose, Inosit, Galactose und Lactose jedoch nicht; Indolbildung negativ; Katalase positiv; Oxidase negativ.

B. cereus var. mycoides unterscheidet sich in physiologischer Hinsicht von B. cereus durch eine negative Lecithinase Reaktion und negative Citratverwertung. Im Gegensatz zu den Angaben von BERGEY (1957) stellten auch GLATHE und SINGH VERMA (1968) bei ihren B. cereus var. mycoides Stämmen das Fehlen der Citratverwertung fest.

Isolierte Stämme: ASw 9, BGr 6, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 18 und 25, AGr 6, 15 und 17 a.

3. Gruppe Bacillus subtilis (9 Stämme)

Morphologie

- a. makroskopisch: Große runzelige Kolonien, matt oder gelegentlich feucht glänzend, Rand gefranst, meist grau-weiß. Manche Formen besitzen eine schleimig-zähe Beschaffenheit (z.B. ASd 27a), oder sind durchscheinend.
- b. mikroskopisch: Schmale Stäbchen, 0,6 bis 0,8 Mikron breit, einzeln oder in langen Fäden. Spore oval, meist zentral oder etwas exzentrisch lokalisiert; keine Aufblähung der Sporenmutterzelle; Motilität variabel.

Physiologische Leistungen

Schwaches Wachstum in Ammonium-Glucose Nährlösung; Gelatinase positiv; Lecithinase negativ; Citratverwertung positiv; MR-VP-Reaktion positiv; Stärkehydrolyse positiv; gutes Wachstum auf Glucose-Schrägagar; Nitritbildung aus Nitrat (aerob und anaerob); Glucose, Sucrose, Mannit, Arabinose und Maltose wurden anaerogen vergoren, Rhamnose, Inosit, Galactose und Lactose jedoch nicht. Indolbildung positiv; Oxidase negativ; Katalase positiv.

Optimale Wachstumstemperatur bei 37⁰ C (Nähragar).

Als B. subtilis oder Varianten dieses Organismus wurde identifiziert: BSw 9; ASd 5, 17b, 18, 19 und 20; BGr 29; ASd 27a und 21 zeigten keine deutliche Kettenbildung, auch Mannit wurde nicht vergoren.

4. Gruppe Bacillus firmus (2 Stämme)

Morphologie

- a. makroskopisch: weiß-gelbliche Kolonien, fein gerunzelt und feucht glänzend, Rand wellenförmig bis gefranst.
- b. mikroskopisch: Schmale Zellen, 0,8 bis 2,0 Mikron, eckig, paarweise in Ketten oder Fäden angeordnet; Spore zentral, zylindrisch und annähernd der gleiche Durchmesser wie bei den vegetativen Zellen; begeißelt.

Physiologische Leistungen

Typisch für B. firmus ist das Fehlen von Wachstum in synthetischer Ammonium-

Glucose Nährlösung sowie die Wachstum hemmende Wirkung von Glucose.
Gelatinase negativ; (Stichkultur und Frazier's Reaktion), Lecithinase negativ;
Citratverwertung negativ; MR-VP-Reaktion negativ; Stärkehydrolyse negativ;
kein Wachstum auf Glucose-Schrägagar; kein Wachstum in 10 % NaCl-Bouillon;
keine Säure in Ammonium-Glucose Nährlösung; Nitritbildung aus Nitrat (aerob
und anaerob); Glucose wird ohne Gas vergoren, aber nicht Sucrose, Mannit,
Arabinose, Maltose, Rhamnose, Inosit, Galactose und Lactose.

Wachstumstemperatur bei 25⁰ C: gut nach 24 Std.

30⁰ C: gut nach 24 Std.

37⁰ C: gut nach 24-48 Std.

42⁰ C: kein Wachstum.

Als B. firmus wurde klassifiziert: BSw 6 (unbegeißelte Variante); AGr 13b.

3. Differenzierung der Gram-negativen Bakterien der Gruppe O/F = -/-

Die Identifizierung von chromogenen, gelben Stäbchen erfolgte nach den Richtlinien von HENDRIE, MITCHELL und SHEWAN (1968) und mit Hilfe von BERGEY's Manual (1957). Die Bildung von gelben Pigmenten unter Bakterien ist bei den Gram-negativen Organismen zu beobachten bei den Corynebacteriaceae (Arthrobacter sp., Cellulomonas sp., Brevibacterium sp.), bei manchen Achromobacteraceae (Flavobacterium sp.) und bei gewissen Myxobacterales (Cytophaga sp.).

1. Arthrobacter aurescens (AGr 23)

Morphologie

a. makroskopisch: Kleine runde Einzelkolonien, gelb, halbkugelig, glänzend, glattrandig und undurchsichtig. Wachstumsoptimum 25⁰ C, kein Wachstum bei 37⁰ und 42⁰ C. Besseres Wachstum auf Fleisch-Hefe-Extrakt Agar als auf Nähragar.

b. mikroskopisch: Gram-negative bis Gram-variable Stäbchen, 0,5 x 0,9 zu 1,5 bis 2,0 Mikron (Nähragar); manche Zellen kokkenartig und deutlich Gram-positiv (nach einer Woche); keine Sporen, unbegeißelt.

Physiologische Leistungen

O/F = -/- nach 14 Tagen +/-; Gelatinase negativ; Stärkehydrolyse positiv; Nitritbildung aus Nitrat (aerob); keine Säure von Glucose, Sucrose, Mannit, Arabinose, Maltose, Rhamnose, Inosit, aber schwach von Galactose (5 Tage); Lecithinase negativ; MR-VP-Reaktion negativ; Indolbildung negativ; Glucose-Schrägar positiv; H_2S von Eisen-Drei-Zuckeragar negativ; Elliot's Pigmentlösung negativ; ebenso King's Medium A und B negativ; Citratverwertung schwach positiv; Oxidase und Katalase negativ; kein Wachstum in Ammonium-Glucose Nährlösung; mäßiges Wachstum auf Glucose-Schrägar. Aufgrund dieser Leistungen kamen in engere Wahl die Organismen

(1) Flavobacterium lutescens: Gram-negativ, unbegeißelt, gelb chromogen, Oxidase negativ und Nitrat-Reduktase positiv; fakultativ anaerob; Wasserkeim

(2) Arthrobacter aurescens: Gram-negativ bis Gram-variabel, gelb pigmentiert, Nitrat-Reduktase positiv, Stärkehydrolyse positiv; Variable Stäbchen und kokkenartige Formen, aerober und ubiquitärer Bodenbewohner.

Ein wichtiges Merkmal war, daß der isolierte Stamm Gram-variable bis positive Formen aufwies, darüberhinaus auch kokkenartige Zellen (Zysten?) in älteren Kulturen (1 Woche) bildete. Demnach dürfte Stamm AGr 23 als ein Arthrobacter aurescens zu klassifizieren sein.

2. Arthrobacter sp. ? (AGr 24)

Morphologie

a. makroskopisch: kleine, wässrige, runde Kolonien, grau-bräunlich (Nähragar) durchsichtig und glattrandig.

b. mikroskopisch: Gram-negative, variable Stäbchen, auch kokkenartige Formen; manche Zellen intensiv violett (Zysten) gefärbt; Größe der Zellen 0,5 bis 0,7 zu 1,0 bis 2,0 Mikron; 2 violette Polkörperchen je Zelle; begeißelt.

Physiologische Leistungen

Gelatinase negativ (Stichkultur), Frazier's Reaktion positiv; Citratverwertung positiv; MR-VP-Reaktion negativ; Elliot's Pigmentlösung negativ; King's Medium A und B negativ; Säure und H_2S in TSI-Agar negativ; Stärkehydrolyse negativ; Indolbildung negativ; Nitritbildung aus Nitrat (aerob und anaerob); Glucose (schwach) anaerogen

vergoren, übrige Kohlenhydrate negativ; kein Wachstum in Ammonium-Glucose Nährlösung; schlechtes Wachstum auf Glucose-Schrägagar.

Wachstumstemperaturen bei 25° C: sehr gutes Wachstum nach 48 Std.

30° C: mäßiges Wachstum nach 48 Std.

37° C: kein Wachstum

42° C: kein Wachstum

Die mikroskopischen Untersuchungen deuteten auf eine Einordnung als Pseudomonas hin; jedoch das Fehlen jeglicher Pigmentbildung sowie das Ausbleiben oxidativer Verwertung von Kohlenhydraten und von Wachstum im synthetischen Ammonium-Glucose Nährlösung wiesen eher auf einen Vertreter der Corynebacteriaceae (Arthrobacter sp.) hin. Eine weitere spezifische Diagnostik ist erforderlich.

Tabelle 12a

Herkunft und taxonomische Zugehörigkeit der isolierten, eisenreduzierenden Bakterien aus vergleyten bzw. pseudovergleyten Zonen

Horizont	S _w		S _d		G _r		
	(1)	(2)	(1)	(2)	(1)	(2)	(3)
Bodenextrakt-Glucose Agar (Medium A)	1	4	9	7	8	5	2
Glycerin-Pepton Agar (Medium B)	-	2	15	-	5	13	-

(1) = Pseudomonas sp. (2) = Bacillus sp. (3) = Arthrobacter sp.

4. Auffallende biochemische Leistungen der isolierten Bakterien in Zusammenhang mit der eisenreduzierenden Kapazität

Schwefelwasserstoffbildung

Die H₂S-Entwicklung wurde geprüft in 2 verschiedenen Medien:

1. im Pepton-Eisenagar (Stichkultur) und 2. in Eisen-Drei-Zuckeragar (kombinierter Stich-Schrägagar). Unter den isolierten Pseudomonaden wurden keine H₂S-Bildner gefunden. Diese Eigenschaft wird nur bei bestimmten Stämmen (aber nicht allen) von Ps. aeruginosa beobachtet (LIJK VAN RIESEN, 1963). Von den eisenreduzierenden Bazillen war nur ein Stamm aus der Gruppe B. subtilis (AGr 9)

nachweisbar zur H_2S -Entwicklung befähigt. Schwefelwasserstoff wird von den genannten Organismen nicht gebildet. Infolgedessen ist sie nicht mit der Eisenreduktion gekoppelt.

Reduktion von Lackmusmilch

Nach einer Bebrütung von 7 Tagen bei 25°C riefen 52 der insgesamt 71 (etwa 70 %) isolierten eisenreduzierenden Organismen eine eindeutige Reduktion in Lackmusmilch hervor. Diese als Entfärbung des Redoxindikators Lackmus erkennbare Reaktion darf als potentielle Reduktionskapazität aufgefaßt werden. Unter den Bazillen waren sämtliche Stämme von B. cereus und B. cereus var. mycoides positiv, bei B. subtilis 4 von 6 Stämmen, bei B. firmus nur eine der beiden Isolierungen. Unter den 20 als Ps. denitrificans eingeordneten Stämmen waren 16 positiv, unter den 8 Ps. stutzeri Formen 4, unter den 5 Ps. fluorescens-putida Vertreter 2 und der einzige Ps. desmolytica Stamm ebenfalls positiv. Demnach scheint die Mehrzahl der eisenreduzierenden Bakterien in Lackmusmilch eine deutliche Reduktion hervorzurufen.

Kohlenhydratabbau

Säurebildung bzw. Gasentwicklung aus Kohlenhydraten zur Prüfung der Verwertbarkeit wurde in einer 0,5 % (w/v) Kohlenhydrat-Pepton-Nährlösung durchgeführt. Alle Kulturen wurden 14 Tage lang beobachtet. Gasbildung (Durhamröhrchen) konnte bei keiner der isolierten eisenreduzierenden Bakterien festgestellt werden, was auf das Fehlen des Enzyms Formiat-Hydrogenlyase (CO_2 und H_2 Bildung) schließen läßt. Aus diesem Grunde scheidet der potentiell reduzierende Wasserstoff im Reduktionsmechanismus aus.

Nitratreduktion und Denitrifikation

Von besonderem Interesse für die bakterielle Eisenreduktion war der Befund, daß nur 3 der 71 isolierten, eisenreduzierenden Bakterien keine Nitratreduktion im neutralen, aeroben oder im alkalischen, anaeroben Milieu aufwiesen. Unter den nitratreduzierenden Stämmen konnten 33 die Reduktion bis zum gasförmigen Stickstoff vorantreiben, darunter Ps. denitrificans (20), Ps. stutzeri (8), eine intermediäre Form sowie 4 Sporenbildner. Die Rolle des nitratreduzierenden Vermögens für die Fähigkeit der Eisenreduktion wird auch durch diese Ergeb-

nisse bestätigt.

II. Die Ökologie der eisenreduzierenden Bakterien

Eisenreduzierende Enterobacteriaceae und Bacillaceae konnten in den verschiedenen Horizonten der geprüften Bodentypen eindeutig nachgewiesen werden. Wenn es nun umgekehrt gelingen würde, durch Reinkulturen von Bakterien in einem sterilen Boden unter Wassersättigung in vitro eine Reduktion des Eisens, und eine Erniedrigung der Redoxpotentiale zu erzielen, dann wäre der Beweis erbracht, daß die ubiquitären Bodenbakterien am Vergleungsprozeß zumindest beteiligt sind. Zur Prüfung wurde ein hämatithaltiger, homogener Boden bei Wassersättigung mit Sucrose als C-Quelle in Erlenmeyerkolben mit Reinkulturen von Aerobacter aerogenes, Aerobacter cloacae, Bacillus polymyxa und Bacillus circulans beimpft und bebrütet (30° C). Bacillus circulans erhielt zur Förderung des Wachstums zusätzlich 2 ml einer 0,1 %igen, sterilen Hefeextraktlösung. Veränderungen in pH und Eh, sowie in der Eisen(II)-Konzentration der überstehenden Lösung wurden während der Entwicklung der Bakterien über eine Periode von 66 Tagen durch electrometrische Messungen verfolgt. Der Verlauf der errechneten Reduktions-Intensität (rH) in den einzelnen Kulturen, sowie in Proben beimpft mit einem heterogenen Bodeninokulum, ist in Abb. 7 dargestellt. In Abb. 8 ist der Entwicklungsverlauf der einsetzenden Eisenreduktion graphisch in logarithmischem Maßstab aufgezeichnet.

4.1. Intensität und Umfang der Eisenreduktion in künstlich überfluteten Böden

Im allgemeinen unterlagen die Veränderungen in der Reduktionsintensität bei den verschiedenen Organismen der gleichen Tendenz (s. Abb. 7). Nach der Beimpfung stieg zunächst die Reduktionsintensität rasch an und erreichte bei allen Kulturen ein Maximum innerhalb von 7 Tagen. Im weiteren Verlauf stellte sich bei den einzelnen Organismen ein bestimmtes Niveau ein, das durch eine relativ konstante Reduktions-Intensität charakterisiert wurde. In seinem Wesen stellte der Verlauf der rH etwa das Spiegelbild einer wachsenden Bakterienpopulation dar. Daraus kann auf eine direkte Beziehung zwischen Bakterienvermehrung und Reduktions-

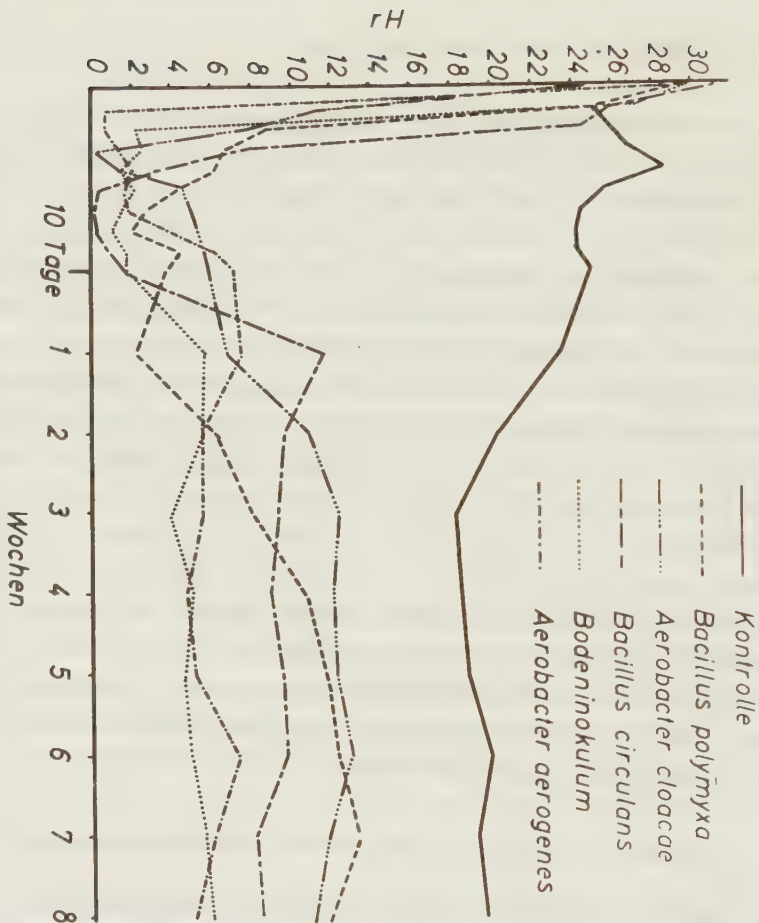


Abb. 7: Entwicklungsverlauf der Reduktionsintensität (rH) einiger eisenreduzierender Bakterien in künstlich überfluteten Böden

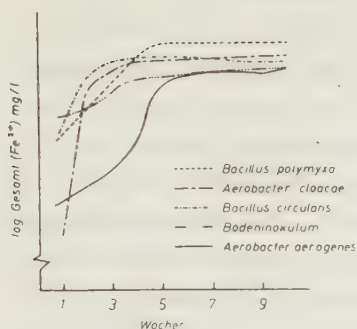


Abb. 8: Entwicklungsverlauf der bakteriellen Eisenreduktion in künstlich überfluteten Böden.

Intensität geschlossen werden. Aus der Entwicklung der Eisenreduktion (Abb. 8) kann abgeleitet werden, daß nicht nur der Verlauf, sondern auch das Ausmaß der reduzierten Eisen(II)-Ionen artspezifisch sind. Bei allen Organismen sowie im Falle der Impfung mit einer Bodensuspension - also ein Gemisch der verschiedensten Mikroorganismen - erhöhte sich nach etwa 4 Wochen die Konzentration an Eisen(II)-Ionen in der flüssigen Phase der Ansätze nicht mehr, sondern blieb weiterhin ungefähr konstant. Der Beginn dieser Periode stimmte etwa überein mit dem Anfang der konstanten Reduktions-Intensität. Vergleicht man aber die durchschnittliche Reduktions-Intensität der einzelnen Organismen mit der mittleren Konzentration der Ferroionen während dieser konstanten Periode (vom 30. bis zum

66. Tag), so ließ sich keine direkte Beziehung zwischen diesen beiden Parametern feststellen (s. Tab. 13).

Tabelle 13

Eisenreduktion (Fe^{2+} mg/l) und Reduktions-Intensität (rH) einiger fakultativ anaeroben Bakterien vom 30. bis zum 66. Tag in künstlich überfluteten Böden

Organismus	mg Fe^{2+} /l	rH	Eh (mV)	pH
Bodeninnokulum	175	4,8	-215	6,0
<u>A. aerogenes</u>	154	5,5	-220	6,4
<u>B. circulans</u>	318	8,9	- 75	5,7
<u>B. polymyxa</u>	875	10,7	- 31	6,0
<u>A. cloacae</u>	342	11,8	+ 19	5,6

4.2. Der Bereich des Redoxpotentials

Der Unterschied im Potential zwischen dem höchsten und niedrigsten Redoxpotential wird als maximaler Eh-Sprung bezeichnet. Das Redoxpotential fiel am stärksten ab bei B. circulans (-309 mV nach 4 Tagen), ihm folgten aber in geringem Abstand die Potentiale von A. aerogenes (-284 mV nach 3 Tagen) und B. polymyxa (-259 mV nach 7 Tagen). Die Ansätze, welche mit einer Bodenaufschwemmung beimpft worden waren, erreichten einen maximalen Eh-Abfall von -289 mV (nach 7 Tagen). Am geringsten war dieser Wert bei Aerobacter cloacae (-179 mV nach 3 Tagen). Das Redoxpotential der mit Sucrose gesättigten Versuchsansätze betrug bei der Inokulation im Durchschnitt +410 mV. Durch die bakterielle Tätigkeit wurde somit ein maximaler Potentialsprung von 719 mV (B. circulans) bzw. 699 mV (Mischkultur) ausgelöst. Am geringsten war die maximale Potentialveränderung bei A. cloacae; sie betrug 589 mV. Aber auch in den unbeimpften Vergleichsparallelen verminderte sich das Ausgangspotential in geringem Maße, vermutlich als Folge einer erhöhten Reduktionskraft der fortschreitenden Hydrolyse der gelösten Sucrose ($\text{Sucrose} \rightleftharpoons \text{Glucose} + \text{Fructose}$). Es könnte überraschen, daß die Reinkultur von B. circulans einen höheren Wert des Eh erreichte als die Mischkultur, in der ja B. circulans wahrscheinlich auch enthalten war. Möglich wäre es jedoch, daß der Unterschied innerhalb der Fehlergrenze lag. Sollte die Differenz reproduzierbar sein - eine Überprüfung wurde nicht unternommen - dann wäre das ein Beweis, daß bei der großen Zahl der Bakterienarten des Gemisches hemmende oder entgegengesetzte Wirkungen innerhalb der Population vorlag.

4.3. Veränderungen in der Wasserstoffionenkonzentration

Das ursprünglich alkalische Milieu der Ansätze (pH = 8,5) erfuhr durch die Fermentation eine Ansäuerung bis in das schwach-saure Gebiet. Die stärkste Versauerung wurde bei Aerobacter cloacae gemessen und erreichte einen Tiefstwert von pH = 5,2 (nach 8 Tagen), während A. aerogenes seinen Tiefstpunkt schon bei pH = 6,0 (nach 8 Tagen) erreicht hatte. Bei B. circulans war eine Reaktion um pH = 5,4 die größte potentiometrische Azidität (nach 8 Tagen), ein Niveau, das auch in den mit einer Bodensuspension beimpften Ansätzen registriert wurde (nach 6 Tagen). B. polymyxa erreichte schon nach 7 Tagen einen minimalen Wert

von pH = 5,9. In allen Ansätzen folgte nach dem Tiefpunkt ein erneuter Anstieg des pH-Wertes, erreichte jedoch im Höchstfall nur pH = 6,5.

4.4. Eisenreduktion und Gleybildung

Mit Ausnahme von B. circulans bildeten die 3 Versuchsorganismen in den Ansätzen schon nach 24-48 Std. Gas. Durch die kräftige aerogene Gärung entstanden im Boden kraterförmige Gaskanäle, an deren Rändern die ersten Vergleyungserscheinungen zu beobachten waren. Bei den Ansätzen von Aerobacter cloycae und Bacillus circulans waren die ersten Anzeichen der Graufärbung nach 7 Tagen feststellbar, bei Aerobacter aerogenes und Bacillus polymyxa etwa nach 13 Tagen. Auch die mit einer Bodensuspension beimpften Ansätze ließen nach 14 Tagen meist lokale Vergleyungssymptome erkennen. Dabei wurden neben kleinen blau-grauen Flecken auch einige mehr diffus grau verfärbte Zonen sichtbar. Es schien, als ob zumindest zwei verschiedene Organismen für die unterschiedlichen Symptome verantwortlich seien, denn auch die Vergleyungserscheinungen der Reinkulturen ließen sich visuell differenzieren. Während A. aerogenes und A. cloacae im oberen Abschnitt der Bodenschicht eine graue, mit zunehmender Tiefe schwächer werdende Gleyzone bildeten, waren B. polymyxa und B. circulans gekennzeichnet durch eine deutlich blau-graue Vergleyung, die sich scharf von dem rotbraunen Boden absetzte. Am Ende der Versuchsdauer war bei B. circulans die Vergleyungsschicht nur oberflächlich und dünn, bei B. polymyxa dagegen fast 1 cm dick. In den unbeimpften Kontrollansätzen trat keine Vergrauung des Bodenmaterials auf. Die bakteriell bedingte Eisenreduktion in Verbindung mit Vergleyung im Boden ist aufgrund vorliegender Versuche als zusammenhängender Vorgang möglich. Eine Vergleyung tritt vermutlich nicht bei allen Böden als Folge der Eisenreduktion in Erscheinung. Es ist denkbar, daß in einem an Eisenoxid sehr reichen Boden die intensive Rotfärbung die graue Farbe überdeckt.

III. Die Physiologie der eisenreduzierenden Mikroorganismen

4.1. Die Verbreitung der Fähigkeit Eisen zu reduzieren unter den Mikroorganismen

Zur Prüfung der Frage, unter welchen Gruppen der Mikroorganismen die Fähigkeit

zur Reduktion von Eisenoxiden verbreitet ist, wurde eine Auswahl typischer, weitverbreiteter Vertreter der Bodenflora qualitativ auf ihre Fähigkeit der Eisenreduktion untersucht. Unter den Bakterien wurden besonders Arten der Bazillen und Enterobakterien geprüft, da ihre Beteiligung an der Eisenreduktion im Boden schon bei den quantitativen Populationsuntersuchungen nachgewiesen wurde. Insgesamt wurden Reinkulturen von 25 Bakterien, 10 Pilzen, 8 Actinomyceten und 7 Hefen qualitativ (aerob und anaerob) auf ihre Fähigkeit der Eisenreduktion geprüft (s. Tab. 14).

Tabelle 14

Das Vorkommen der potentiellen Fähigkeit Eisen zu reduzieren bei Bakterien, Schimmelpilzen, Actinomyceten und Hefen in Glucose-Asparagin Nährlösung mit 0.1 % Hämatitpulver. Qualitativer Nachweis in An- und Abwesenheit von KNO_3 (0,2 %), nach Bebrütung von 5 Tagen (Bakterien, Hefe, 25° C) bzw. 7 Tagen (Pilzen, Actinomyceten, 30° C) unter aeroben bzw. anaeroben Bedingungen

	aerob			anaerob		
	ohne NO_3^-	mit NO_3^-	NO_2^-	ohne NO_3^-	mit NO_3^-	NO_2^-
<u>I. Bakterien</u>						
<u>Enterobacteriaceae</u>						
Aerobacter aerogenes	+	-	+	+	-	+
Aerobacter cloacae	+	-	+	+	-	+
Citrobacter freundii	+	-	+	+	-	+
Escherichia coli	+	-	+	+	-	+
Paracolobactrum aerogenoides	+	-	+	+	-	+
Serratia marcescens	+	-	+	+	-	+
<u>Bacillaceae</u>						
Bacillus alvei	+	+	+	+	+	+
B. cereus	+	-	+	+	-	+
B. cereus var. mycoides	+	-	+	+	-	+
B. circulans (36°)	+	-	+	+	+	+
B. megaterium	+	+	+	-	-	+
B. mesentericus	+	+	+	+	-	+

(Forts. S. 91)

Tabelle 14 (Forts.)

	aerob			anaerob		
	ohne NO_3^-	mit NO_3^-	NO_2^-	ohne NO_3^-	mit NO_3^-	NO_2^-
<u>I. Bakterien</u>						
<i>B. polymyxa</i>	+	-	+	+	-	+
<i>B. pumilus</i>	+	+	-	+	+	-
<i>B. sphaericus</i>	±	±	-	±	±	-
<i>B. subtilis</i>	+	+	+	+	+	+
<i>B. thuringiensis</i>	+	-	+	+	-	+
<i>Alcaligenes faecalis</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Azotobacter chroococcum</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Flavobacterium aquatile</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Micrococcus roseus</i>	+	-	+	+	-	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+	+	+	+	-	+
<i>Sarcina lutea</i>	-	-	-	-	-	-
<u>II. Pilze</u>						
<i>Actinomucor repens</i>	±	-	+	-	-	±
<i>Aspergillus ustus</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Alternaria tenuis</i>	-	-	+	-	-	-
<i>Chaetomium indicum</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Cladosporium</i> sp.	-	-	-	-	-	-
<i>Fusarium oxysporum</i>	+	-	+	-	-	+
<i>Fusarium solani</i>	+	-	+	-	-	+
<i>Penicillium</i> sp.	-	-	-	-	-	-
<i>Trichoderma lignorum</i>	-	-	-	-	-	-
<u>III. Actinomyceten</u>						
<i>Nocardia corallina</i>	-	-	+	-	-	±
<i>Nocardia globerula</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Nocardia paraffinae</i>	-	-	+	-	-	+

Tabelle 14 (2. Forts.)

	aerob			anaerob		
	ohne NO_3^-	mit NO_3^-	NO_2^-	ohne NO_3^-	mit NO_3^-	NO_2^-
III. <u>Actinomyceten</u>						
<i>Nocardia rubra</i>	-	-	+	-	-	+
<i>Mycobacterium lacticola</i> (36°)	±	-	+	-	-	+
<i>Mycobacterium rubrum</i>	-	-	+	-	-	+
<i>Micrococcus rhodochrous</i>	-	-	+	-	-	+
<i>Streptomyces</i> sp.	-	-	+	-	-	-
IV. <u>Hefen</u>						
<i>Candida</i> sp.	+	+	+	+	+	+
<i>Hansenula</i> sp.	+	+	+	+	+	+
<i>Lipomyces</i> sp.	-	-	-	-	-	-
<i>Pichia</i> sp.	±	±	-	±	±	-
<i>Rhodotorula</i> sp.	+	+	+	+	+	+
<i>Saccharomyces</i> sp.	-	-	-	-	-	-
<i>Sporobolomyces</i> sp.	-	-	-	-	-	-
Kontrolle	-	-	-	-	-	-

Die Fähigkeit zur Reduktion von Eisenoxid (Hämatit) scheint besonders unter den Bacillaceae und Enterobacteriaceae allgemein verbreitet zu sein. Aber auch manche Hefen und die Fusarien unter den Schimmelpilzen setzen Eisen(II)-Ionen aus Fe_2O_3 frei. Dagegen scheinen die Actinomyceten ohne Bedeutung zu sein. In dieser Gruppe konnte nur bei M. lacticola (36°) eine schwache Eisenreduktion nachgewiesen werden. Unter anaeroben Bedingungen waren nur die fakultativ anaeroben Bakterien zur Eisenreduktion befähigt. Kein oder nur ein sehr geringes Wachstum wurde bei den Actinomyceten und Schimmelpilzen festgestellt, und nur ein schwaches unter den Hefen. Bemerkenswert ist weiter, daß mit Ausnahme von Bacillus pumilus und Bacillus sphaericus alle zur Eisenreduktion befähigten Organismen

über das Enzym Nitrat-Reduktase verfügen (als Nitritbildung nachgewiesen).

Diese Schlußfolgerung wird aus der Tatsache gezogen, daß die Eisenreduktion unterblieb, wenn Nitrat zugesetzt wurde. Nur bei Bacillus pumilus und Bacillus sphaericus konnte Nitrateinfluß nicht nachgewiesen werden.

Diese Sporenbildner reduzierten das hinzugefügte Eisenoxid auch in Anwesenheit von Nitrat im Medium. Weitere Ausnahmen bildeten B. alvei, B. megaterium, B. mesentericus und B. subtilis und Ps. aeruginosa, welche zwar Nitrat-Reduktase positiv waren, aber doch in Anwesenheit von Nitrat eine Eisenreduktion (allerdings schwach) erkennen ließen. Es wäre aber möglich, daß diese Eisenreduktion erst nach dem Verschwinden der Nitrationen einsetzte. In diesem Falle müßte allerdings die reduzierte Menge in Anwesenheit von Nitrat geringer sein als im Medium ohne diesen Zusatz, wie im nächsten Abschnitt geprüft werden soll.

4.2. Die quantitative Bestimmung der Kapazität Eisen zu reduzieren

Zum Nachweis, ob 1. die mikrobielle Eisenreduktion einen aeroben oder anaeroben Prozeß darstellt, und 2. ob Nitrat im Medium das Ausmaß der reduzierten Eisenmenge beeinflusst, wurde die Kapazität der Eisenreduktion quantitativ bestimmt. Dazu wurden jetzt Kölbchen benutzt, um die reaktionsfähige Oberfläche des Eisenoxids so groß wie möglich zu machen. Die Messungen wurden unter aeroben- bzw. anaeroben Bedingungen sowie mit und ohne Nitrat durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tab. 15 enthalten.

Durch die quantitative Bestimmung der Kapazität Eisen zu reduzieren wurde ersichtlich, daß

1. im allgemeinen die Eisenreduktion unter als "aerob" geltenden Bedingungen größer war als unter anaeroben Verhältnissen,
2. die Eisenreduktion durch den Zusatz von Nitrat vermindert, oder sogar verhindert wurde. Dieser Befund trifft auch zu für B. alvei, B. megaterium, B. mesentericus, B. subtilis und Pseudomonas aeruginosa. Ohne Einfluß blieb jedoch Nitrat bei solchen Bakterien, die nicht über das Enzym Nitrat-Reduktase verfügen, wie z.B. bei B. pumilus und B. sphaericus. B. pumilus ließ sogar eine Erhöhung des Reduktionsausmaßes erkennen. Es scheint, als ob Eisenoxid und Nitrat kompetitive Substrate für das Enzym Nitrat-Reduktase (Cytochrom: Nitrat-Oxido-Reduktase EC 1.9.61) sind. Daß eine Nitratreduktion stattgefunden

Tabelle 15

Die Kapazität der Eisenreduktion ($\text{mg Fe}^{2+}/\text{l}$) bei einigen Bakterien, Schimmelpilzen und Hefen in Glucose-Asparagin-Nährlösung mit 0,1 % Hämätinpulver, in An- bzw. Abwesenheit von KNO_3 (0,1 %); Bebrütung der Bakterien und Hefen (5 Tage bei 25° C) bzw. der Pilze (14 Tage bei 30° C) unter aeroben und anaeroben Bedingungen

I. Bakterien	aerob			anaerob		
	ohne NO_3^-	pH	mit NO_3^-	ohne NO_3^-	pH	mit NO_3^-
<u>Enterobacteriaceae</u>						
<i>Aerobacter aerogenes</i>	6,0	4,5	3,1	5,3	4,0	4,4
<i>Aerobacter cloacae</i>	4,0	7,8	1,0	7,8	2,0	6,2
<i>Citrobacter freundii</i>	1,6	6,9	0	7,0	2,5	4,7
<i>Escherichia coli</i>	3,1	5,0	0	5,4	8,0	5,2
<i>Serratia marcescens</i>	13,0	7,4	3,5	7,5	-	-
<i>Paracoloclostridium aerogenoides</i>	14,8	7,9	7,2	8,8	7,0	6,1
<u>Bacillaceae</u>						
<i>Bacillus alvei</i>	6,0	6,0	5,1	6,0	0	6,8
<i>B. cereus</i>	4,2	5,7	0	6,0	1,5	5,1
<i>B. cereus var. mycoides</i>	3,5	6,7	0	6,1	0	5,4
<i>B. circulans</i> (36°)	28,5	6,2	0	6,4	4,8	6,8
<i>B. megaterium</i>	5,6	5,7	4,2	5,9	0	6,8
<i>B. mesentericus</i>	8,0	7,4	5,9	8,4	1,5	5,4

Tabelle 15 (Forts. v. S. 94)

	aerob				anaerob			
	ohne NO ₃ ⁻	pH	Fe ²⁺	mit NO ₃ ⁻	ohne NO ₃ ⁻	pH	Fe ²⁺	mit NO ₃ ⁻
I. <u>Bakterien</u>								
<u>Bacillaceae</u>								
<i>B. polymyxa</i>	3,5	5,3	0	5,9	3,0	4,8	0	6,0
<i>B. pumilus</i>	6,5	6,9	8,8	7,1	2,0	5,6	3,1	5,4
<i>B. sphaericus</i>	1,0	8,1	1,0	8,8	0	7,1	0	7,1
<i>B. subtilis</i>	3,3	7,1	2,4	8,4	0,9	6,6	0	8,0
<i>B. thuringiensis</i>	2,6	6,0	0	6,0	1,0	5,2	0	6,1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	20,0	6,3	16,4	6,8	4,0	7,8	3,0	8,7
<i>Micrococcus roseus</i>	2,6	6,6	2,0	6,8	3,9	6,9	0	6,9
II. <u>Hefen</u>								
<i>Candida</i> sp.	1,0	5,3	0	6,0	3,0	6,8	0	6,9
<i>Hansenula</i> sp.	2,6	7,6	0	7,8	3,0	6,1	0	6,5
<i>Rhodotorula</i> sp.	2,4	6,2	0	6,5	1,5	6,9	0	6,9
III. <u>Pilze</u>								
<i>Actinomyces repens</i>	6,2	7,8	4,7	8,3				
<i>Fusarium oxysporum</i>	4,6	6,1	2,5	7,3				
<i>Fusarium solani</i>	9,7	7,4	6,5	7,9				
Kontrolle	0	7,1	0	7,1	0	7,1	0	7,1

hatte, war indirekt an dem Anstieg des pH-Endwertes im Medium ersichtlich. Durch diese Ergebnisse wurde die Vermutung bestätigt, daß die Reduktion der Eisen(III)-Oxide nicht ein rein zufälliger Nebenvorgang mikrobieller Stoffwechselleistungen ist, sondern wie Nitrat einen physiologischen Zweck erfüllt. Diese Aufgabe dürfte nicht nur analog mit der Reduktion von Nitrat sein, sondern darüber hinaus noch vom gleichen Enzym durchgeführt werden.

4.3. Eisenreduktion und reduzierende Substanzen

Der akkomodative Stoffwechsel vieler aerober Sporenbildner kann zur Anhäufung von intermediären reduzierenden Stoffwechselprodukten führen (S. 16). Unter den geprüften organischen Säuren, Alkoholen und Zuckern war besonders das Glycerin als Ausgangssubstanz zur Synthese solcher reduzierender Metaboliten geeignet. Wäre die Ausscheidung von reduzierenden Substanzen des Typs Dihydroxyaceton für die Eisenreduktion verantwortlich zu machen, so müßte 1. die Kapazität der Eisenreduktion bei Bakterien in Anwesenheit des Glycerin größer sein als bei Verwendung von Glucose und 2. Nitrat das Ausmaß der Eisenreduktion nicht oder nur sehr wenig beeinflussen können. Diese Hypothesen wurden mit der üblichen Methode zur quantitativen Bestimmung der Eisenreduktion dadurch geprüft, daß anstatt Glucose nun 2 % (v/v) Glycerin (98 %) mit und ohne KNO_3 (0,1 %) verwendet wurde (Tab. 16).

Aus den Daten dieser Tabelle sind zwei Ergebnisse zu entnehmen:

1. Unter aeroben sowie unter anaeroben Bedingungen ist die Kapazität zur Eisenreduktion in der glycerinhaltigen Variante wesentlich geringer als in dem glucosehaltigen Standardmedium.
2. Nitrat kann in den aeroben und anaeroben Proben das Ausmaß der reduzierten Mengen Eisen(II)-Ionen deutlich herabsetzen.

Aus diesen Ergebnissen muß gefolgert werden, daß unter aeroben und anaeroben Bedingungen die Bildung von reduzierenden Substanzen als Ursache der Eisenreduktion keine Bedeutung zukommt, da auch bei Glycerin als C-Quelle die Reduktion des Eisen(III)-Oxids von Nitrat unterdrückt werden kann. Die allgemein geringere Ausbeute an Eisen(II)-Ionen dürfte bei der unterschiedlichen physiologischen Verwertung des Glycerins im Vergleich zu der Hexose Glucose liegen. Ferner

Tabelle 16

Kapazität der Eisenreduktion einiger Bakterien in 2 % Glycerin-Asparagin Nährlösung mit 0,1 % Hämätin in An- bzw. Abwesenheit von KNO_3 (0,1 %). Bebrütung aerob und anaerob (25°); Eisenreduktion in ppm

Organismen	aerob				anaerob			
	2 % Glucose		2 % Glycerin		2 % Glycerin		2 % Glycerin	
	Fe^{2+}	pH	ohne NO_3	mit NO_3	ohne NO_3	mit NO_3	ohne NO_3	mit NO_3
			Fe^{2+}	Fe^{2+}	Fe^{2+}	Fe^{2+}	pH	pH
Aerobacter aerogenes	6,0	4,5	3,5	4,7	0	5,4	2,5	6,5
Escherichia coli	3,1	5,0	3,5	6,2	0	6,4	2,5	5,4
Bacillus cereus	4,2	5,7	1,5	7,6	0	7,7	1,0	7,3
Bacillus mesentericus	8,0	7,4	4,8	6,1	1,5	6,6	2,5	7,4
Bacillus pumilus	6,5	6,9	2,0	7,5	1,8	7,5	1,0	7,6
Bacillus subtilis	3,5	7,1	3,0	7,1	0,5	6,7	2,1	7,3
Pseudomonas aeruginosa	20,0	6,3	7,0	7,4	2,5	7,6	2,6	7,5
Kontrolle	0	7,0	0	7,1	0	7,1	0	7,1

konnte nachgewiesen werden, daß wässrige Lösungen von Dihydroxyaceton (bis zu 0,01 % und bei pH = 8,0) zur Eisenreduktion nicht befähigt sind. Eine Reduktion des Eisens trat auch dann nicht auf, wenn Kulturfiltrate von Aerobacter aerogenes, Bacillus polymyxa und B. circulans (36°) - nach fünftägiger Bebrütung durch ein Bakterienfilter (0,3 μ) gegeben - mit 5 ml einer 1,0 %igen Fe_2O_3 -Suspension oder einer 0,1 %igen FeCl_3 -Lösung versetzt und 24 Stunden stehen gelassen wurden.

Dagegen vermochte aber Dihydroxyaceton in einer Konzentration von 100 ppm eine 0,1 %igen TTC-Lösung noch zu reduzieren (zu rotem Formazan), wenn die Reaktion in den alkalischen Bereich gebracht wurde. Glycerin allein wirkte nicht reduzierend auf TTC. Aber auch die sterilen Kulturfiltrate waren in der Lage die TTC-Lösung zu reduzieren. Obwohl die Bildung von reduzierenden Substanzen aus Glycerin demnach ohne Zweifel ist, bleibt ihre Bedeutung für die Reduktion von Eisen(III)-Ionen fraglich, denn Metaboliten wie Dihydroxyaceton sind reversible Zwischenprodukte, die einer weiteren Dissimilation unterliegen. So wird Glycerin von Aerobacter aerogenes durch Dehydrierung über das Dihydroxyaceton in Glyceraldehyd verwandelt und weiter zum Pyruvat dissimiliert (MAGASANIK, BROOKE und KARIBIAN, 1953). Bei Bacillus subtilis erfolgt die Verwertung von Glycerin in gleicher Weise (MINDICH, 1968). Als Zwischenprodukt kann sich zwar Dihydroxyaceton zeitweilig im Medium anhäufen, es wird aber später auf dem Wege über Pyruvat in den Krebszyklus eingeschleust und zu CO_2 und H_2O oxydiert. Fehlt der Sauerstoff, dann wird Glycerin zwar ebenfalls über Dihydroxyaceton zum Pyruvat dehydriert (-4H), jedoch nicht vollständig oxydiert. Aus dieser physiologischen Verwertung des Glycerins wird die Bildung von reduzierenden Substanzen deutlich, und könnte ferner die Feststellung erklären, weshalb es unter anaeroben Bedingungen zu einer geringeren Eisenreduktion kommt.

4.4. Einfluß von Wirkstoffen auf die bakterielle Eisenreduktion

Zwar sind die Bakterien, die potentiell zur Eisenreduktion befähigt sind, ubiquitär vorhanden, ob es aber zur Eisenreduktion kommt, hängt neben den Umweltbedingungen mitunter von dem Gehalt an Nährstoffen ab. Es war das Verdienst von KNIGHT und PROOM (1950) nachzuweisen, daß mehrere Vertreter der Bazillen auxotroph für bestimmte Vitamine und/oder Aminosäuren sind. So ist z.B. der

Organismus Bacillus circulans, der sich als einer der stärksten eisenreduzierenden Bakterien erwiesen hat, für manche Aminosäuren und B-Vitamine auxotroph, obwohl es unter den Stämmen verschiedene Ansprüche gibt. Aber auch Bacillus polymyxa (Biotin), B. pumilus (Biotin), B. sphaericus (Aminosäuren; Aneurin und/oder Biotin) und B. cereus (gewisse Aminosäuren) brauchen in geringen Mengen spezifische Wirkstoffe. Zur Prüfung der Bedeutung gewisser Vitamine und Wirkstoffe für die eisenreduzierende Kapazität wurde der 2 %igen Glucose-Asparagin Standardnährlösung (ohne Hefeextrakt) Bodenextrakt oder Hefeextrakt zugesetzt und die eisenreduzierende Kapazität einiger prototropher und auxotropher Bakterien quantitativ bestimmt.

1. Einfluß von Bodenextrakt

Die üblichen Ingredients einer synthetischen 2 %igen Glucose-Asparagin Nährlösung wurden in 1 l. Bodenextrakt gelöst, mit 0,1 % Hämatitpulver versetzt und die Eisenreduktion folgender Bakterien ermittelt (Tab. 17).

Tabelle 17 .

Einfluß von Bodenextrakt auf die Kapazität der Eisenreduktion einiger prototropher und auxotropher eisenreduzierender Bakterien; Bebrütung 5 Tage (25° C). Fe^{2+} in ppm.

	Standardmedium		mit Bodenextrakt	
	Fe^{2+}	pH	Fe^{2+}	pH
<u>A. aerogenes</u>	6,0	4,5	6,4	4,3
<u>B. circulans</u>	6,0	6,2	4,5	6,5
<u>B. polymyxa</u>	3,5	5,3	10,0	5,5
<u>B. pumilus</u>	6,5	6,9	9,8	6,7
<u>Ps. aeruginosa</u>	20,0	6,3	22,0	6,3
Kontrolle	0	7,0	0	7,0

Im allgemeinen wurde die Eisenreduktion nach dem Zusatz von Bodenextrakt erhöht. Besonders deutlich war der Anstieg bei B. polymyxa und B. pumilus, die beide für Biotin (einer der Hefewachstumsfaktoren) auxotroph sind. Im geringeren Maße war auch eine fördernde Wirkung bei den prototrophen Organismen Aerobacter

aerogenes und Pseudomonas aeruginosa zu beobachten. Wahrscheinlich beruht die stimulierende Wirkung bei diesen Bakterien auf Spurenelementen, die im Bodenextrakt reichlich vorhanden sind (COCHRANE, 1961). Dagegen blieb die Menge an reduziertem Eisen in Anwesenheit von Bodenextrakt bei B. circulans unter dem Standardwert. Im Standardmedium war 0,05 % Hefeextrakt enthalten, der bei der Prüfung des Bodenextraktes nicht zugesetzt wurde. B. circulans braucht zum optimalen Stoffwechsel außer Wirkstoffen noch gewisse Aminosäuren, die wahrscheinlich nicht oder unzureichend im benutzten Bodenextrakt enthalten waren. Aus den Ergebnissen könnte man folgern, daß Bodenextrakt zwar Wirkstoffe enthält, diese aber in ihrer Zusammensetzung und Quantität einer 0,05 %igen Hefeextraktlösung nicht entspricht. Daß Bodenextrakt bestimmte Wachstumsfaktoren enthalten kann, wurde schon im Jahre 1943 von LOCHHEAD und CHASE festgestellt. Später berichteten LOCHHEAD und THEXTON (1952) jedoch, daß bei den meisten Bodenbakterien Vitamin B₁₂ (Cyanocobalamin) den Zusatz von Bodenextrakt erübrigte. Nach Angaben dieser Forscher darf weiter angenommen werden, daß etwa 50 % der Bodenbakterien, darunter besonders die Arten von Pseudomonas und Azotobacter (BAGASARYAN, 1965), zur Ausscheidung dieses Vitamins befähigt sind. Aber nicht nur Bakterien, sondern auch Algen beteiligen sich an der Selbstversorgung des Phytoedaphons mit Wirkstoffen (LUND, 1967). Da sowohl Algen und Pseudomonaden bis zu einer Tiefe von 120 cm in den vergleyten Böden vorgefunden wurden, dürfte das Vorkommen gewisser Wirkstoffe potentiell gesichert sein.

2. Einfluß von Hefewachstumsfaktoren

Wie weit sich die fördernde Wirkung bestimmter Vitamine auf die Eisenreduktion auswirkt, wurde anhand steigender Mengen von Hefeextrakt (Difco) verfolgt, welche der 2 %igen Glucose-Asparagin Nährlösung zugesetzt wurden; die Abhängigkeit der eisenreduzierenden Kapazität bestimmter auxotropher und prototropher Bakterien von ihrem Vitaminbedarf ist in Abb. 9 graphisch dargestellt.

Die getesteten prototrophen Organismen (Aerobacter aerogenes, Bacillus mesentericus und Pseudomonas aeruginosa), sowie die auxotrophen Bakterien (B. circulans, B. polymyxa) verhielten sich zunächst einheitlich, indem die Kapazität zur Eisenreduktion durch geringe Menge an Vitaminen gefördert wurde. Während Hefeextrakt bei A. aerogenes, B. mesentericus und B. polymyxa bis zu einer Konzentration von 0,15 % stimulierend wirkte, sich darüber hinaus jedoch nur

geringfügig günstig bzw. ungünstig bemerkbar machte, zeigten sich bei B. circulans und Pseudomonas aeruginosa deutlich entgegengesetzte Effekte bei steigendem Vitamingehalt. Besonders fördernd wirkten die Hefewachstumsfaktoren auf die Eisenreduktion von Bacillus circulans, wo der Zusatz von 0,3 % Hefeextrakt das Ausmaß der Eisenreduktion um das 40-fache zu steigern vermochte. Negativ wirkten

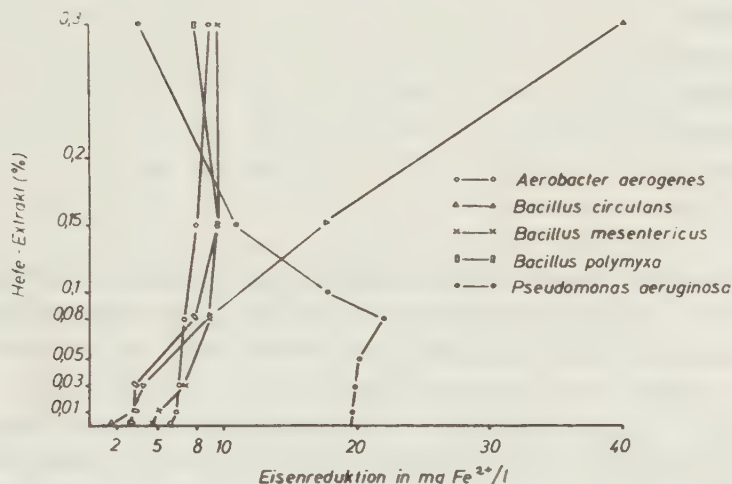


Abb. 9: Einfluß steigender Mengen von Hefeextrakt auf die Kapazität zur Eisenreduktion einiger ubiquitärer Bakterien; Bebrütung 5 Tage (25° C).

sich dagegen steigende Gaben von Vitaminen auf die Eisenreduktion von Pseudomonas aeruginosa aus. Die Erklärung dürfte bei der Stoffwechselaktivität liegen. Während bei B. circulans die steigenden Mengen Vitamine eine zunehmende Aktivität des Gesamtstoffwechsels hervorriefen - darunter womöglich eine verstärkte Aktivität des Enzyms Nitrat-Reduktase - dürfte diese Steigerung bei Ps. aeruginosa eine progressiv abnehmende Intensität des Energiestoffwechsels bewirkt haben. Daß eine erhöhte Stoffwechselaktivität stattgefunden hatte, ging aus den pH-Endwerten der Kulturen hervor. Mit Ausnahme von Ps. aeruginosa lagen diese Werte bei 0,3 % im Vergleich zu 0,05 % Hefeextrakt deutlich tiefer (Tab. 18).

Tabelle 18

Einfluß von Hefeextrakt (0,3 %) auf die Stoffwechselaktivität gemessen an dem Versauerungsgrad im Vergleich zum Standardmedium (0,05 % Hefeextrakt); Medium: 2 % Glucose-Asparagin Nährlösung; Bebrütung 5 Tage bei 25° C

Organismen	pH nach Zusatz Hefeextrakt	
	0,05 %	0,3 %
<u>A. aerogenes</u>	4,5	4,4
<u>B. circulans</u>	6,2	5,1
<u>B. mesentericus</u>	7,4	4,9
<u>B. polymyxa</u>	5,3	4,9
<u>Ps. aeruginosa</u>	6,3	6,6
Kontrolle	7,0	7,0

Im Hinblick auf die Aktivität im Boden, könnten diese Ergebnisse so interpretiert werden, daß in nährstoffarmen Bodenbereichen, wie sie im Unterboden vorliegen, die Pseudomonaden und die prototrophen Arten unter den Bazillen für die Eisenreduktion an erster Stelle verantwortlich sind.

Wie der Abb. 9 weiter zu entnehmen ist, liegt die Kapazität der Eisenreduktion bei den geprüften Bakterien im Standardmedium (0,05 % Hefeextrakt) unter dem maximalen Wert der einzelnen Organismen. Da dieses Maximum jedoch bei den verschiedenen Organismen stark vom Vitamingehalt abhängt, aber eine ausreichende Differenzierung aufgrund der Standardmenge an Hefeextrakt möglich ist, sollte für vergleichende Untersuchungen die ursprüngliche Konzentration beibehalten werden.

4.5. Einfluß der Eisenoxidform auf die Eisenreduktion

Mit zunehmender Alterung der Eisenoxide steigt der Kristallisationsgrad an, wobei die Oxide der α -Reihe aufgrund des geringeren zur Kristallisation erforderlichen Energiebedarfs häufiger entstehen als die der γ -Reihe (S.). Umgekehrt müßte die mikrobielle Reduktion der pedogenen Eisenoxide je zugeführte Energiemenge um so größer sein, je geringer die Kristallinität fortgeschritten ist. Anhand einiger eisenreduzierender Bakterien wurde diese Hypothese überprüft und

statt Hämatit der üblichen 2 % Glucose-Asparagin Nährlösung die gleiche Menge (w/v) Eisenphosphat (FePO_4), Eisen(III)-Oxidhydrat (= Eisensubcarbonat), Lepidokrokit ($\gamma\text{-FeOOH}$) oder Goethit ($\alpha\text{-FeOOH}$) in Pulverform zugesetzt. Die reduzierte Eisenmenge wurde nach 5 Tagen (25°C) quantitativ bestimmt (Tab. 19).

Bei allen geprüften Organismen bestand eine umgekehrte Proportionalität zwischen dem Kristallisationsgrad (Eisenoxidform) und der potentiellen eisenreduzierenden Kapazität: je geringer die Kristallinität, um so stärker die Eisenreduktion. Die Unterschiede in dem Ausmaß der Eisenreduktion lagen in der Akzessibilität der strukturellen Eigenschaften der Oxide begründet. Im Gegensatz zum Hämatit verfügen die amorphen Eisenoxide, das Lepidokrokit sowie das Goethit in ihren Strukturen noch über Wasserstoffbrücken (Hydroxylgruppen) und vergrößern somit die Spaltbarkeit und damit die reaktionsfähige Oberfläche. Die Zugänglichkeit wird bei Lepidokrokit noch erhöht durch seine Schichtstruktur (S. 5). Die reaktionsfähige Oberfläche der Eisenoxide ist jedoch nicht nur abhängig von der Struktur und vom Alterungsgrad, sondern auch von dem pH-Wert des Milieus in dem sie entstanden sind.

4.6. Einfluß des pH-Wertes auf die Eisenreduktion

Der isoelektrische Punkt der meisten Eisenoxide im Boden liegt etwa im Bereich von pH 5,5 - 6,0 (PARKS und DE BRUYN, 1962). Während beim isoelektrischen Punkt die positiven und negativen Ladungen im Gleichgewicht sind, kommt es oberhalb dieses Punktes zum Abdissoziieren von Wasserstoff und somit bei steigendem pH-Wert zu negativen Ladungsverhältnissen. Die Bedeutung der Reaktion im Milieu für das Ausmaß der biologischen Eisenreduktion wurde anhand von 3 Testorganismen erprobt. Aerobacter aerogenes, Bacillus pumilus und Pseudomonas aeruginosa - jeweils ein Vertreter der drei Familien, unter denen sich die eisenreduzierenden Bakterien befinden - wurden wie üblich dem Standardmedium eingimpft, das durch tropfenweise Zugabe von Natriumbicarbonatlösung (2n NaHCO_3) oder Phosphorsäure ($1\text{n H}_3\text{PO}_4$) auf pH = 8,0 bzw. pH = 6,0 eingestellt war. Die Fähigkeit der Eisenreduktion sowie die Veränderung in der Reaktion der Kultur wurde nach 5 Tagen (25°C) bestimmt (Tab. 20).

Tabelle 19

Einfluß der Eisenoxidform auf die Eisenreduktion in 2 % Glucose-Asparagin
Nährlösung. Bebrütung 5 Tage (25° C); Fe^{2+} in ppm

Eisenoxidform:	FePO_4		Fe(OH)_3		δ -FeOOH		α -FeOOH		α -Fe ₂ O ₃	
	Fe^{2+}	pH	Fe^{2+}	pH	Fe^{2+}	pH	Fe^{2+}	pH	Fe^{2+}	pH
<u>A. aerogenes</u>	12,8	4,4	12,7	4,5	10,7	4,7	6,5	4,6	6,0	4,5
<u>B. mesentericus</u>	19,8	5,5	25,5	5,8	13,0	5,9	8,0	5,6	8,0	7,4
<u>B. polymyxa</u>	28,0	5,3	22,0	5,5	12,3	5,8	3,6	5,4	3,5	5,3
<u>B. sphæricus</u>	33,5	7,2	26,6	8,2	14,7	7,6	4,0	8,0	1,0	8,1
<u>Ps. aeruginosa</u>	84,0	6,2	71,0	6,6	45,5	7,3	36,4	6,5	20,0	6,3
Kontrolle	0	7,0	0	7,0	1,5	7,1	1,0	7,1	0	7,0

Tabelle 20

Einfluß der Reaktion des Standardmediums (mit 0,1 % Hämatit) auf das Ausmaß der Eisenreduktion. Bebrütung 5 Tage bei 25° C; Fe²⁺ in ppm

	pH = 6,0		pH = 7,0		pH = 8,0	
	Fe ²⁺	pH	Fe ²⁺	pH	Fe ²⁺	pH
<u>A. aerogenes</u>	4,9	4,1	6,0	4,5	12,7	4,6
<u>B. pumilus</u>	6,0	6,6	6,5	6,9	15,2	6,1
<u>Ps. aeruginosa</u> +)	14,0	7,6	20,0	6,3	16,9	7,3
Kontrolle	0	6,0	0	7,0	0	8,0

+) Farbe des Pyocyanins war bei pH = 7,6 braun, bei pH = 7,3 gelb.

Obwohl die drei Testorganismen sich verschieden verhielten, kann man sagen, daß im alkalischen Milieu mehr Eisen reduziert wurde als im sauren. Besonders deutlich war diese Tendenz bei Aerobacter aerogenes, der mit abnehmender Wasserstoffionenkonzentration eine starke Erhöhung der Eisenreduktion auslöste. Aber auch bei B. pumilus hat sich die Menge des reduzierten Eisen bei einer alkalischen Ausgangsreaktion im Vergleich zu einem sauren Milieu mehr als verdoppelt. Daß der Unterschied zwischen pH = 6,0 und 7,0 nicht deutlich ist, läßt sich aufgrund des gemessenen pH-Endwertes erläutern. Die Verschiebung der Reaktion in alkalischer Richtung von 6,0 auf 6,6 durch die Stoffwechselprodukte von B. pumilus, hat eine Veränderung des Ladungsverhältnisses des vorhandenen Eisenoxids zugunsten der negativen Ladung bewirkt und damit die potentielle Reduktion verstärkt. Aerobacter aerogenes zeigte dagegen eine pH-Verschiebung von 6,0 auf 4,1 und dadurch eine Abnahme der Reduktionsbereitschaft des Eisenoxids.

Pseudomonas aeruginosa konnte im sauren sowie im alkalischen Milieu weniger Eisen reduzieren als im neutralen Bereich, obwohl im sauren Bereich ein starker pH-Anstieg zu beobachten war. Anscheinend hat Pseudomonas aeruginosa bei pH = 7,0 die größte Stoffwechselaktivität. Hier wäre der pH-Anstieg vermutlich auf die Ammoniakbildung zurückzuführen, eine Eigenschaft, die unter den Pseudomonaden allgemein verbreitet ist (KLINGE, 1959). Man könnte hier folgern,

daß nicht die Stoffwechselprodukte sondern der Umfang der Stoffwechselaktivität für die Eisenreduktion von Bedeutung ist.

4.7. Der biochemische Mechanismus der bakteriellen Eisenreduktion

Die Feststellung, daß im nitrathaltigen Medium die Eisenreduktion unterblieb oder zumindest gehemmt wurde, führte zu der Hypothese, die Eisenreduktion als enzymatischen Vorgang zu betrachten. Bei diesem Vorgang würde das dreiwertige Eisen als Substrat und Wasserstoffakzeptor für das Enzym Nitrat-Reduktase (Cytochrom: Nitrat-Oxido-Reduktase EC 1.9.61) dienen können. Aus der Reihe der anorganischen Sauerstoffsäuren kann nicht nur Nitrat, sondern auch Perchlorat (HACKENTHAL, MANNHEIM et al., 1964), Chlorat (PICHINOTY, 1963), Sulfat (POSTGATE, 1965) und vermutlich auch Phosphat von bestimmten Bodenbakterien auf enzymatischem Wege reduziert werden. Den Angaben über die Phosphatreduktion durch Stäbchen (Escherichia coli?), die aus dem Boden isoliert wurden (RUDAKOV, 1927) ist widersprochen worden (LIEBERT, 1927), sowohl aus Erwägungen über den zur Reduktion notwendigen hohen thermochemischen Energieaufwand, als auch aufgrund der fehlenden Reproduzierbarkeit der Ergebnisse. Sicher ist, daß außer Chlorat und Perchlorat (PUIG und AZOULAY et al., 1967), aber nicht Sulfat, als kompetitive Substrate für das gleiche Enzym Nitrat-Reduktase fungieren können. Erfüllt Eisen(III) ebenfalls die Aufgabe eines Substrates für dieses Enzym, dann müssen Nitrat und z. B. Chlorat, aber nicht Sulfat, im Medium das Ausmaß der Eisenreduktion beeinflussen können.

1. Einfluß von Nitrat auf die Eisenreduktion

Zum üblichen 2 %igen Glucose-Asparagin Medium wurde KNO_3 in verschiedenen Konzentrationen zugesetzt, mit eisenreduzierenden Bakterien beimpft und die Eisenreduktion quantitativ nach 5 Tagen bestimmt. Als Testorganismen wurden Aerobacter aerogenes (nit^+), Bacillus mesentericus (nit^+), Pseudomonas aeruginosa (nit^+) und Bacillus pumilus (nit^-) verwendet. Der Einfluß steigender Menge KNO_3 (mg/ml) auf das Ausmaß der Eisenreduktion wird in Abb. 10 dargestellt. Der Verlauf in den Veränderungen der pH-Endwerte der entsprechenden Konzentrationen KNO_3 sind von der rechten Skala abzulesen. Der Pfeil deutet Anfang

und Richtung der pH Veränderungen an.

Abb. 10 zeigt bei *Aerobacter aerogenes* und *Bacillus mesentericus* deutlich eine umgekehrt proportionale Beziehung zwischen der Konzentration an KNO_3 und dem Ausmaß der Eisenreduktion. Daß die Nitrat-Ionen reduziert wurden, geht aus dem Anstieg der pH-Zahlen hervor, verursacht durch die physiologisch-alkalisch wirkenden K-Ionen. Auch bei *Pseudomonas aeruginosa* ist im geringen Konzentrationsbereich (0 bis 1,0 mg KNO_3 /ml) eine ähnliche Abhängigkeit der Eisenreduktion von der Nitratmenge festzustellen, bei höherer Konzentration jedoch nicht mehr, wahrscheinlich weil der Energievorrat im Medium erschöpft war. *B. pumilus* verhielt sich dagegen umgekehrt: mit steigender KNO_3 -Konzentration stieg die Eisenreduktion geringfügig an, bis zu einer Konzentration von 1,0 mg/ml, worauf wieder eine Abnahme erfolgte. Die erhöhte Eisenreduktion ist vermutlich auf das größere Angebot an K-Ionen zurückzuführen, da die

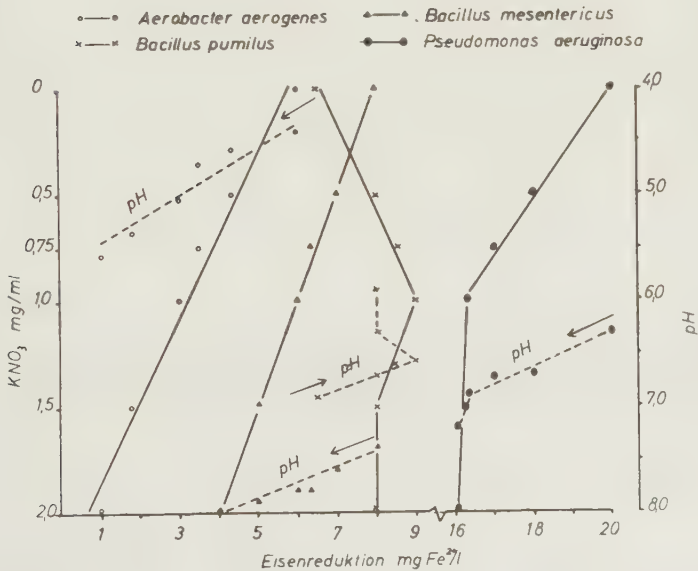


Abb. 10: Einfluß von Nitrat auf die Eisenreduktion.

Abwesenheit des Enzyms Nitrat-Reduktase die Assimilation von Nitrat ausschließt. So wäre auch der starke Rückgang der Reaktion, hervorgerufen durch die Akkumulation des physiologisch sauer wirkenden NO_3^- zu erklären. Daß ein erhöhtes Angebot an Kalium das Wachstum stimuliert und dabei eine verstärkte Säurebildung zur Folge hat wurde schon von SIRNEY et al. (1954) erwiesen.

2. Einfluß von Chlorat auf die Eisenreduktion

Die Rolle der Sauerstoffsäure Chlorat ist weitgehend analog der des Nitrats, wie aus Abb. 11 ersichtlich ist. Hier wurde die Beziehung zwischen steigenden Mengen KClO_3 und der Eisenreduktion graphisch dargestellt.

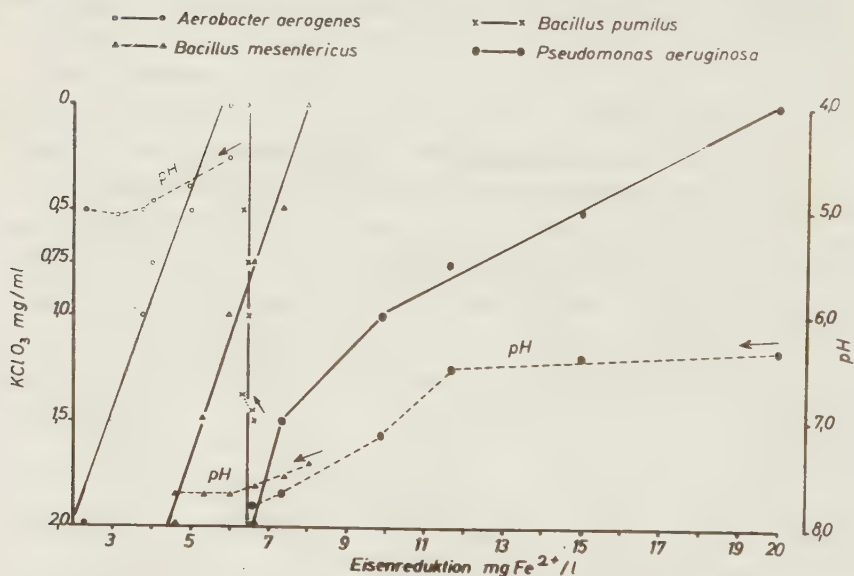


Abb. 11: Einfluß von Chlorat auf die Eisenreduktion

Wie beim Nitrat bewirkten steigende Konzentrationen an KClO_3 eine Abnahme der Eisenreduktion bei A. aerogenes, B. mesentericus und Pseudomonas aeruginosa, blieben jedoch ohne Einfluß auf die eisenreduzierende Kapazität von

B. pumilus (nit⁻).

3. Einfluß von Sulfat auf die Eisenreduktion

Ähnlich wie bei Nitrat und Chlorat wurde nun die Wirkung des Sulfat-Ions auf das Ausmaß der potentiellen Eisenreduktion der gleichen Testorganismen untersucht. Als Medium diente erneut 2 % Glucose-Asparagin Nährlösung, dem K₂SO₄ in den Konzentrationen 0,5, 0,75, 1,0 und 1,5 mg/ml zugesetzt wurden. Die Ergebnisse sind in der Tab. 21 aufgeführt.

Tabelle 21

Einfluß steigender Konzentrationen K₂SO₄ (mg/ml) auf die Eisenreduktion einiger eisenreduzierender Bakterien. Bebrütung 5 Tage (25° C) in 2 % Glucose-Asparagin Nährlösung; pH = 7,0; Fe²⁺ in ppm

K ₂ SO ₄ (mg/ml):	0		0,5		0,75		1,0		1,5	
	Fe ²⁺	pH	Fe ²⁺	pH	Fe ²⁺	pH	Fe ²⁺	pH	Fe ²⁺	pH
<u>A. aerogenes</u>	6,0	4,5	5,8	4,5	5,7	4,5	5,8	4,5	5,8	4,5
<u>B. mesentericus</u>	8,0	7,4	7,5	7,3	7,6	7,3	7,6	7,3	7,6	7,2
<u>B. pumilus</u>	6,5	6,9	6,3	6,8	6,3	6,7	6,3	6,8	6,4	6,8
<u>Ps. aeruginosa</u>	20,0	6,3	21,0	6,4	21,0	6,4	21,0	6,4	20,0	6,5
Kontrolle	0	7,0	0	7,0	0	7,0	0	7,0	0	7,0

Aus der Tab. 21 ergibt sich zwar, daß die Zugabe von K₂SO₄ eine sehr geringe Abnahme der Eisenreduktion zur Folge hatte, sie jedoch nicht in einer Beziehung zur K₂SO₄-Konzentration stand. Die Abnahme wäre möglicherweise auf die wachstumhemmende Wirkung steigender Menge K₂SO₄ zurückzuführen, da im Fall einer Sulfatreduktion das pH ansteigen müßte. Der geringe pH-Anstieg bei Ps. aeruginosa dürfte auf einer erhöhten SO₄²⁻ Aufnahme beruhen, da die meisten Pseudomonaden einen starken Bedarf an Sulfaten haben (KING et al., 1954).

Aus den aufgeführten Versuchsergebnissen sind folgende Schlüsse hinsichtlich des eisenreduzierenden Mechanismus zu ziehen:

1. Nitrat und Chlorat sind kompetitive Inhibitoren der Eisenreduktion, Sulfat

dagegen nicht. Da die beiden ersten Sauerstoffsäuren Substrate (d.h. Wasserstoffakzeptoren) des Enzyms Nitrat-Reduktase sind, müssen auch Eisen(III)-Verbindungen diese Funktion ausüben.

2. Da Nitrat und Chlorat keine kompetitive Wirkung bei der Eisenreduktion solcher Bakterien erkennen ließen, die nicht über das Enzym Nitrat-Reduktase verfügten, müssen zumindest 2 verschiedene Mechanismen zur Fähigkeit der Reduktion von Eisen(III)-Oxiden unter den eisenreduzierenden Bakterien vorliegen. Es ist also zu prüfen, ob Stämme vorhanden sind, die nicht über das Enzym Nitrat-Reduktase verfügen und ob diese Stämme sich in der Intensität der Eisenreduktion von denen unterscheiden, die dieses Enzym besitzen.

4.8. Eisenreduktion bei nit^- Mutanten eisenreduzierender Wildstämme

Unter den Bakterien kommen nach Ansicht von PUIG, AZOULAY und PICHINOTY (1967) zwei Nitrat-Reduktase Typen A und B vor, die sich in vielen Eigenschaften unterscheiden, besonders hinsichtlich ihres Verhaltens dem Chlorat-Ion gegenüber; Chlorat ist ein Substrat für A, stellt aber einen Inhibitor für B dar. Bei manchen Bakterien führt der Verlust von Enzym A ($\text{NO}_3^- + 2\text{H} = \text{NO}_2^- + \text{H}_2\text{O}$) zum gleichzeitigen Verschwinden von Enzym B (Thiosulfatreduktase; Formiat-Hydrogenlyase: $\text{HCOOH} = \text{H}_2 + \text{CO}_2$). Solche pleiotrophen Mutanten, die $\text{nit}^- \text{chl}^- \text{gas}^-$ sind, wurden neuerdings bei Aerobacter aerogenes (STOUTHAMER, 1967) und bei Escherichia coli K 12 isoliert (PUIG und AZOULAY, 1967; VENABLES, WIMPENNY und COLE, 1968). Demnach handelt es sich hierbei um Mutationen, bei denen mehrere Redoxenzymssysteme verloren gegangen sind. PUIG und AZOULAY (1967) vermuten, daß die Mutation im Gen chl A eine Veränderung in den Partikelstrukturen auslöst, welche den Elektronentransport bei verminderter Sauerstoffspannung steuern und die wahrscheinlich auf der zytoplasmatischen Membran lokalisiert sind.

Wäre das Enzym Nitrat-Reduktase A tatsächlich verantwortlich für die Reduktion des Eisens, so müßten nit^- Mutationen der potentiell zur Eisenreduktion befähigten Bakterien gleichzeitig die eisenreduzierende Kapazität abnehmen. Ausgehend von den eisenreduzierenden nit^+ Wildstämmen Aerobacter aerogenes, Bacillus polymyxa, B. circulans, B. cereus und Serratia marcescens wurden mittels der Methode der wiederholten Subkultivierung in chlorathaltiger Nährlösung (bis zu

25 Subkulturen) chloratresistente, nit⁻ Phänotypen gewonnen. Die Mutanten wurden weiter auf chlorathaltigem Minimalagar (Schrägar) zur Unterdrückung von Rückmutationen bei 4⁰ C aufbewahrt.

1. Charakterisierung der isolierten nit⁻ Mutanten

Zur Feststellung ob bei den nit⁻ Phänotypen pleiotrophe Mutationen in Bezug auf Gasbildung stattgefunden haben, wurden die nit⁻ Phänotypen der ursprünglich gas⁺ Wildstämme A. aerogenes, Pseudomonas aeruginosa und Serratia marcescens durch Impfung in 0,1 % KNO₃-Nährlösung, verstärkt mit 0,5 % Glucose, auf Gasentwicklung (Durhamröhrchen) geprüft. Wildstämme von Pseudomonas aeruginosa sind Formiat-Hydrogenlyase negativ. Sie bilden aber Gas infolge der Denitrifikation; Aerobacter aerogenes, Serratia marcescens und Bacillus polymyxa sind Hydrogenlyase positiv, sie reduzieren aber Nitrat nicht bis zum gasförmigen Stickstoff. Serratia marcescens bildet außerdem bei Temperaturen unter 37⁰ C den charakteristischen roten Farbstoff Prodigiosin.

Unter den nit⁻ Mutanten wurden phänotypisch verschiedene, zum Teil pleiotrophe Varianten gefunden. Bei drei nit⁻ Mutanten von A. aerogenes (Bezeichnung AA 1, 2 und 3) hatte sich die Mutation auf den Verlust der Nitritbildung beschränkt und war somit nicht pleiotroph, bei B. polymyxa, Serratia marcescens und Ps. aeruginosa dagegen waren die Mutationen pleiotroph. Die Stämme von B. polymyxa (BP 1, 2 und 3) waren nit⁻ gas⁻; die von Ps. aeruginosa verloren außer der Fähigkeit zur Nitritbildung auch die Enzyme, die zur Durchführung der Denitrifikation benötigt werden. Dagegen waren die pleiotropen Mutationen von Serratia marcescens komplexer Natur: Mit Ausnahme von SM 13, waren alle nit⁻; SM 1 war nit⁻ gas⁻, bildete aber nur schwach Prodigiosin; SM 2 war nit⁻ gas⁻, behielt aber die normale Fähigkeit Prodigiosin zu erzeugen; SM 3 war nit⁻ gas⁻ und verlor die Fähigkeit den roten Farbstoff zu bilden; SM 10 war dagegen nit⁻ gas⁺ prod⁺; SM 13 nit⁻ gas⁻ prod⁻; SM 11 wie SM 1 war nit⁻ gas⁻, zeigte aber eine schwache rosa Färbung.

Es scheint als ob die Mutation im Gen Nitrat-Reduktase A eine Reihe von anderen phänotypischen Eigenschaften beeinflußt (Hydrogenlyase, Nitrit-Reduktase, Prodigiosin), und es ist anzunehmen, daß alle diese Redoxenzyme in einem Cystron (Funktionseinheit) des Chromosoms lokalisiert sind. Es wäre aber auch möglich, daß die Mutation im nit-Gen sich über direkt benachbarte Gene erstreckt

hatte. Das Ausmaß der Schädigung könnte dann eine Erklärung für die unterschiedliche Prodigiosin Bildung liefern, wenn angenommen wird, daß das Gen Prodigiosin dem Gen Nitrat-Reduktase benachbart ist. In diesem Zusammenhang sind die Ergebnisse von ADHYA, CLEARY und CAMPBELL (1968) mit nit^- Mutanten von Escherichia coli und des Phagen Lambda aufschlußreich. Diesen Forschern gelang es aufgrund von Transduktionsversuchen mit Phage Lambda und chlorat-resistenten nit^- Mutanten von Escherichia coli das Gen Nitrat-Reduktase zu lokalisieren, in der Reihenfolge gal-bio-nit. Diese Feststellung beruhte u.a. darauf, daß alle gal $^-$ nit $^-$ Phänotypen auch bio $^-$ waren, während umgekehrt alle bio $^-$ nit $^-$ Varianten gal $^+$ waren. Scheinbar wirkt sich die Schädigung des Gen Nitrat-Reduktase in den benachbarten genen aus, nimmt aber mit zunehmender Entfernung von der Lage der Information des Gens Nitrat-Reduktase ab.

2. Die Kapazität der Eisenreduktion von nit^- Mutanten

Die Kapazität der Eisenreduktion einiger nit^- Phänotypen eisenreduzierender Bakterien wurde wie üblich in 2 % Glucose-Asparagin Nährlösung quantitativ bestimmt. Zur Prüfung, ob die Anwesenheit von Nitrat die Eisenreduktion dieser nit^- Mutanten noch beeinflussen könnte, wurden Parallelbestimmungen in Nährlösungen mit KNO_3 (0,1 %) durchgeführt. Die nit^- Phänotypen wurden auf KClO_3 -haltigem Schrägagar gezüchtet, jeweils eine Öse nach 24 Std. in 0,1 % KNO_3 Nährlösung geimpft und nach weiteren 24 Std. auf Nitritbildung geprüft. Von folgenden nit^- Mutanten wurde die eisenreduzierende Kapazität ermittelt (Tab. 22).

Aus Tab. 22 ergibt sich folgendes:

1. Nach Verlust des Enzyms Nitrat-Reduktase wurde die eisenreduzierende Kapazität der Organismen zwar im allgemeinen stark verringert, aber nicht ausgeschaltet.
2. Der Zusatz von Nitrat zum Medium hatte keinen Einfluß auf das Ausmaß der Eisenreduktion.

Eine Ausnahme zu Punkt 1 machten die nit^- Stämme von B. polymyxa, die sogar mehr Eisen reduzierten als der ursprüngliche Wildstamm. Beide geprüften Mutanten waren nicht nur nit^- , sondern auch gas $^-$, d.h. sowohl Nitrat-Reduktase A

Tabelle 22

Die eisenreduzierende Kapazität einiger $\text{nit}^- \text{chl}^-$ Mutanten eisenreduzierender Wildstämme. Bebrütung in 2 % Glucose-Asparagin Nährlösung mit 0,1 % Hämatin. Fe^{2+} in ppm nach 5 Tagen (25° C) Bebrütung.

	Wildstämme		nit^- Phänotypen			
	Fe^{2+}	pH	ohne NO_3^- Fe^{2+}	pH	mit NO_3^- Fe^{2+}	pH
<u>A. aerogenes</u> :	6,0	4,5				
AA 1 :			3,8	5,4	3,8	5,4
AA 3 :			4,4	5,3	4,4	4,5
<u>B. polymyxa</u> :	3,5	5,3				
BP 3 :			6,7	5,3	6,8	5,3
BP 11:			6,2	5,2	6,2	5,2
<u>B. cereus</u> :	4,0	5,7				
BCE 1 :			3,5	6,7	3,5	6,7
BCE 3 :			3,9	5,1	4,0	5,1
<u>B. circulans</u> : +)	28,5	6,2				
BC 2 :			4,8	6,6	5,0	6,6
BC 3 :			4,9	6,7	4,9	6,6
<u>Ps. aeruginosa</u> :	20,0	6,3				
PA 2 :			9,0	7,5	8,5	7,7
PA 3 :			9,5	7,5	9,7	7,7
<u>S. marcescens</u> :	13,0	7,4				
SM 1 :			10,8	5,8	10,7	7,5
SM 11:			9,7	4,4	6,3	7,7

+) wurde bei 36° C bebrütet (Optimum)

als auch Nitrat-Reduktase B waren als Wasserstoffdonatoren ausgefallen. Die sonst so kräftige Gasbildung unterblieb folglich. Eine Klärung dieser Beobachtung konnte nicht gefunden werden.

Zusammenfassend dürfte der Schluß berechtigt sein, daß die Bakterien, die potentiell zur Eisenreduktion in der Lage sind, über mindestens 2 Mechanismen der Eisenreduktion verfügen. In einem davon spielt die Funktionseinheit Nitrat-Reduktase als Wasserstoffüberträger zwischen der biologischen Oxydation (Cytochrome) und der Reduktion der Eisenoxide die Rolle des verbindenden Glieds. Die meisten Enzyme haben eine hohe Spezifität und katalysieren nur bestimmte Reaktionen. Die geringe Spezifität des Enzyms Nitrat-Reduktase geht aus der Verschiedenheit seiner Substrate hervor, da nicht nur Nitrat, sondern auch andere anorganische Sauerstoffsäuren wie Perchlorat und Chlorat als solche dienen können. Schon QUASTEL, STEPHENSON und WHETHAM (1925) beobachteten die enzymatische Reduktion von Chlorat durch E. coli, verwarfen jedoch die Beteiligung des Enzyms Nitrat-Reduktase mit der Begründung "chlorat is a salt which so seldom forms a part of bacterial substrates that it can hardly be worth while to possess an enzyme for using it ... except for purposes of suicidal war". Wenn auch Chlorat als unphysiologisches Substrat im Boden gelten muß, so wäre doch die physiologische Funktion der Eisen(III)-Oxide als Wasserstoffakzeptor einer großen Anzahl ubiquitärer, heterotropher Bakterienarten von außerordentlich großem Nutzen.

"La seule réalité objective, ce sont les rapports
des choses d'où résulte l'harmonie universelle"

Henri Poincaré

(1854-1912; La valeur de la science)

V. KAPITEL

Diskussion

Wenn in der Problemstellung dieser Arbeit 5 Fragen aufgeworfen wurden, so wäre es jetzt aufgrund der erzielten Ergebnisse an der Zeit sie zu beantworten. Die Grundfrage worin ein ursächlicher Zusammenhang zwischen Mikroorganismen und Vergleyung beruht, lautete

1. Gibt es eisenreduzierende Bakterien ?

Bei dieser Frage wurde ausgegangen von der Überlegung, daß die weltweite Verbreitung des Phänomens der Vergleyung das Vorkommen von ubiquitären Bakterien voraussetzt, die unter bestimmten Voraussetzungen zur Reduktion von Eisenoxiden befähigt sind. Trifft diese These zu, so spielen die geographischen, zeitlichen und räumlichen Faktoren bei der Probeentnahme zum Nachweis dieser Flora eine untergeordnete Rolle. Anhand von quantitativen, mikrobiologischen Untersuchungen an einem Gley und zwei unterschiedlich pseudovergleyten Bodentypen gelang es die Richtigkeit dieser Hypothese experimentell zu beweisen. In den untersuchten Böden konnte nachgewiesen werden, daß Bakterien, die potentiell zur Eisenreduktion befähigt sind, in jedem untersuchten Bodentyp sowie in den aufbauenden Horizonten vorkommen, unabhängig davon, ob eine visuelle Vergleyung stattgefunden hatte oder nicht.

2. Wie ist diese Flora quantitativ und qualitativ zusammengesetzt ?

Unter den Bakterien, die bei künstlichen Anzuchtbedingungen Eisenoxid zu reduzieren vermochten, ließen sich zwei Gruppen unterscheiden:

1. Aerobe bis fakultativ anaerobe Bakterien der Familien Bacillaceae, Enterobacteriaceae und Pseudomonadaceae;
2. Obligat anaerobe Bakterien der Gattungen Clostridium (N_2 -Bindner) sowie Desulfotomaculum und Desulfovibrio (Sulfatreduzierer).

Wie üblich bei den Bodenbakterien verringerte sich die Population der ersten Gruppe mit zunehmender Bodentiefe von etwa 1 bis 4 Million Keime je g trock. Oberboden auf rund 10 bis 100 tausend je g in den von Staunässe beeinflussten Zonen der untersuchten Bodentypen. Nicht nur absolut, sondern auch prozentual -

bezogen auf die bakterielle Gesamtflora - konnte kein Anstieg der eisenreduzierenden Flora in den vergleyten Zonen festgestellt werden. Aber auch die obligat-anaeroben N_2 -bindenden Clostridien nahmen mit der Bodentiefe ab von einigen Hunderttausend im A-Horizont auf etwa Dreitausend in den pseudovergleyten bzw. vergleyten Zonen der Profile. Daß Clostridien zur Eisenreduktion befähigt sind, wurde schon von STARKEY und HALVORSON (1927) frühzeitig vermutet, als sie in anaerob inkubierten Bodenproben, die nach einiger Zeit Eisenreduktion zeigten, Sporenbildner vom Typ Clostridium sporogenes vorfanden. Cl. sporogenes ist jedoch nicht zur Bindung von Luftstickstoff befähigt (BERGEY, 1957). Bis heute sind nur 6 der 94 von BERGEY aufgeführten Arten der Gattung Clostridium mit Sicherheit zur N_2 -Bindung befähigt, obwohl das Gegenteil nur bei einigen nachgewiesen wurde. Zweifelsohne ist die Eigenschaft atmosphärischen Stickstoff zu binden von besonderer Bedeutung für die Besiedlung und Anpassung von Biotopen, wie sie in pseudovergleyten und vergleyten Bodenzonen vorliegen.

Wie die Clostridien sind auch die obligat anaeroben Sulfatreduzierer am stärksten im Oberboden vertreten. Im A-Horizont betrug ihre Anzahl etwa 1000 bis 10 000 je g trock. Boden und sank bis auf 100 Keime je g Boden im G_r -Horizont. Ihre Beteiligung am Vorgang der Vergleyung ist aber nur dann von Bedeutung, wenn der Boden sulfatreich ist. Kommt es unter solchen Umständen zu einer erkennbaren Sulfatreduktion, so entsteht das schwarze oder schwarzgraue FeS. STARKEY (1966) stellte folgende Formel für die Reaktion auf:



Dieser Reaktion nach kommt es im Boden zu einem pH Anstieg, eine Tendenz die in den meisten Gleyen nicht beobachtet wurde (BLOOMFIELD, 1950). Auch in dem hier untersuchten Gley wurde eine zunehmende Versauerung im Unterboden registriert (pH KCl = 4,6). Man kann deshalb ALBRECHT (1941) nicht zustimmen, wenn er Vergleyungserscheinungen als Folge anaerober Sulfatreduktion zu erklären versucht. Vielmehr sind die anfangs erwähnten, ubiquitären fakultativ und obligat anaeroben Bakterien verantwortlich zu machen, obwohl die Fähigkeiten zur Eisenreduktion zunächst nur unter künstlichen Anzuchtbedingungen erbracht wurde. Bis jetzt wurde die Ansicht vertreten, daß die Fähigkeit der Eisenreduktion nur verhältnismäßig wenig Bakterienarten besitzen. So gelang es BROMFIELD (1954a) nur aus dem Oberboden eines vergleyten Bodens einige, zur Eisen-

reduktion befähigte Bakterien wie Aerobacter aerogenes, Bacillus polymyxa, B. circulans und Escherichia coli zu isolieren. Dagegen erbrachten die besprochenen quantitativen und qualitativen mikrobiologischen Untersuchungen an unterschiedlich vergleyten Böden eine Fülle von ubiquitären Bakterien, die unter künstlichen Anzuchtbedingungen dreiwertiges Eisen in die zweiwertige Form zu reduzieren vermochten. Eine Differenzierung der fakultativ anaeroben, eisenreduzierenden Flora ergab, daß ein unterschiedlicher Anteil dieser Population aus Vertretern der Gattung Bacillus und der Gruppe Coli-Aerobacter von den Enterobacteriaceae bestand. Im Höchstfall bildeten diese beiden Gruppen 98,3 % der eisenreduzierenden Gesamtflora (im B_{vA_1} -Horizont der Pseudogley-Braunerde). Der Gesamtanteil an Enterobakterien und Bazillen an der eisenreduzierenden Gesamtflora nahm mit zunehmender Bodentiefe zugunsten noch unbekannter, eisenreduzierender Bakterien ab. Die Identifizierung von eisenreduzierenden Stämmen aus dem S_w , S_d und G_r -Horizont erbrachten jedoch neben ubiquitären Bazillen eine große Anzahl von Pseudomonaden, die zur Eisenreduktion befähigt waren. Es wäre durchaus möglich, daß ein Teil dieser Pseudomonaden bei der quantitativen Ermittlung (MPN) der eisenreduzierenden Gesamtflora erfaßt wurden.

Welche Bakterien herrschen in den Böden vor ?

Nach Angaben von CLARK (1967) gehören mindestens 25 % der Bodenbakterien (eingeschlossen sind die Actinomyceten) zu den Bazillen und Actinomyceten, 65 % zu den Corynebakterien und die restlichen 10 % bestehen aus Arten der Gattungen Pseudomonas, Azotobacter, Achromobacter und einigen anderen.

Um so interessanter ist der Befund, daß es bei den eisenreduzierenden Bakterien aus den von Staunässen geprägten Zonen im wesentlichen um Vertreter der Gattungen Bacillus und Pseudomonas, und nur vereinzelt um Spezies der Gattung Arthrobacter (Corynebacteriaceae) handelte. In diesem Zusammenhang sei auch auf die Identifizierungen von Bakterien aus vergleyten Bodenzonen, die von LOUB (1960) sowie von JORDAN et al. (1967) unternommen wurden, hingewiesen. Unabhängig von einander kamen sie zu dem Ergebnis, daß Vertreter der Gattungen Bacillus und Pseudomonas als typische Bewohner dieser vom Wasser beeinflussten Zonen zu betrachten sind. JORDAN et al. berichteten weiter, daß die Mehrzahl der isolierten Stämme Nitrat reduzierten bzw. denitrifizierten. Auch bei 68 der insgesamt 71 isolierten Bakterien, die zur Eisenreduktion befähigt waren, konnte

das Enzym Nitrat-Reduktase nachgewiesen werden. Dieser Befund führte mitunter zu der Hypothese, daß diese Eigenschaft eine bedeutende Rolle beim Vorgang der Eisenreduktion zuzuschreiben und als Anpassung an Biotopen zu deuten wäre.

Welche Arten dürfen zu den "eisenreduzierenden Bakterien" gerechnet werden ?

Unter den eisenreduzierenden Bazillen, die aus vergleyten Zonen isoliert wurden, waren die Spezies B. cereus, B. cereus var. mycoides, B. subtilis und B. firmus vertreten. Die Kapazität zur Eisenreduktion dieser Arten konnte später bei der Prüfung an Stammkulturen bestätigt und die Reihe um einige andere Arten wesentlich erweitert werden (Tab. 15, S. 94, 95). Auch unter den Lactose-verwertenden Enterobakterien wurde die Fähigkeit Eisen zu reduzieren nachgewiesen bei den Spezies Aerobacter aerogenes, A. cloacae, Escherichia coli, Citrobacter freundii, Serratia marcescens und Paracitrobacterium aerogenoides. Nicht zuletzt sind die eisenreduzierenden Arten der Gattung Pseudomonas zu erwähnen, besonders Ps. aeruginosa, und die aus den vergleyten Zonen isolierten Stämme von Ps. denitrificans, Ps. stutzeri, Ps. fluorescens und Ps. putida. Es sind vor allem in stehenden Gewässern häufig beobachtete, anspruchslose Keime (RUSCHKE, 1968), die aufgrund der Fähigkeit zahlreiche Kohlenwasserstoffe verwerten zu können, besondere Bedeutung erlangen. Gerade in tieferen Bodenschichten, wo nur schwer abbaubare organische Substanzen vorhanden sind, stellen diese einfachen Ansprüche die Voraussetzung für eine Anpassung dar. Daß C- und N-Verbindungen in den von Staunässe beeinflussten Zonen vorkommen, wurde anhand der untersuchten Profile erwiesen. Einerseits gelangen diese organischen Stoffe wahrscheinlich mit dem Sickerwasser in das Grund- bzw. Stauwasser, andererseits steigt das Wasser in der Naßphase oft bis in die humushaltigen Horizonte und nimmt dabei auch organische Stoffe auf. Bei der Überlegung, ob diese Bakterien den Vorgang der Vergleyung im Laufe der Zeit herbeiführen können, sind folgende Erkenntnisse zu beobachten:

1. alle sind ubiquitäre Bodenbewohner,
2. zum größten Teil sind es Bakterien, die das organische Nitrat als Wasserstoffakzeptor bei abnehmender Sauerstoffspannung benutzen können,
3. die Mehrzahl der eisenreduzierenden Organismen verfügt über fermentative Eigenschaften.

Vermutlich gibt es im Boden noch andere Bakterienarten, die unter bestimmten Bedingungen Eisenoxid reduzieren und lösen können. Ob außer Bakterien noch Schimmelpilze und Hefen bei Wassersättigung für die Reduktion der vorhandenen Eisen(III)-Verbindungen verantwortlich zu machen sind, scheint aufgrund ihrer Ansprüche auf Sauerstoff und Empfindlichkeit für niedrige Redoxpotentiale unbegründet. Zwar erwiesen sich zwei *Fusarium*-Arten und einige Hefen unter künstlichen Anzuchtbedingungen zur Eisenreduktion befähigt, in den reduzierten Verhältnissen auf etwa 120 cm Bodentiefe dürfte ihre Tätigkeit jedoch bedeutungslos sein. Das Fehlen von Schimmelpilzen im untersuchten G_r -Horizont bestätigte diese Vermutung. Schon LOUB (1960) stellte die Abwesenheit von Schimmelpilzen in vergleyten Zonen fest. Auch den vorwiegend photosynthetisch aktiven Algen ist zumindest in den hydromorphen Böden unserer Klimabereiche keine besondere Rolle zuzuschreiben. Das Vorkommen im Unterboden beruht wahrscheinlich auf Einspülung aus dem Oberboden. Dagegen dürften bei Berücksichtigung der bereits aufgeführten 3 Charakteristika eisenreduzierender Bakterien, bestimmte Actinomyceten von der Beteiligung an der Eisenreduktion nicht ausgeschlossen werden, obwohl unter den geprüften Reinkulturen keine zur Eisenreduktion befähigt war. Weitere Forschungen wären hier notwendig.

3. Sind Vertreter dieser Bakterien in der Lage unter Erniedrigung des Redoxpotentials eine Vergleyung im Labor herbeizuführen ?

Anhand der weit verbreiteten Bodenbakterien *Aerobacter aerogenes*, *A. cloacae*, *Bacillus polymyxa* und *B. circulans* gelang es künstlich im Labor diese Frage in vitro in wassergesättigten Bodenproben zu beantworten. In Reinkultur gelang es, in Anwesenheit einer Energiequelle in einem sterilen, eisenhaltigen Boden vergleyungsähnliche Prozesse auszulösen. Dabei kamen zu

1. einer rasch ansteigenden Reduktion der Eisenoxide,
2. einem starken Absinken des Redoxpotentials,
3. einer Versauerung des ursprünglich alkalischen Milieus.

Diese Prozesse sind weitgehend analog mit jenen, die im Feld an überfluteten Böden beobachtet wurden (S. 9 und 12). In den vorliegenden Versuchen erniedrigte sich das Redoxpotential maximal um etwa 700 mV, ein Unterschied, der in der Größenordnung des theoretischen Standardpotentials im Fe^{3+}/Fe^{2+} - System

lag (S. 11). Wie auf S. 12 berichtet wurde, liegt das Potential, bei dem die Eisenreduktion einsetzt, in den Böden je nach den Milieubedingungen zwischen einem Eh-Bereich von etwa +500 mV bis +200 mV. Zum objektiven Vergleich von Redox-Zuständen wurde deshalb der rH-Wert herangezogen. In den besprochenen Versuchen variierten die durchschnittlichen rH-Werte der eisenreduzierenden Kulturen in der stationären Phase zwischen rH 5 - 12. Nach FLAIG, SCHARRER und JUDEL (1955) beträgt der rH-Wert gut strukturierter Tschernoseme und Braunerden etwa rH 24 - 26, während in einem vergleyten Podsol der rH-Wert schon auf 21,9 angestiegen war. Nach Angaben von PONOMAREVA et al. (1964) liegt der Grenzwert, bei deren Überschreitung in überfluteten Tschernosemen und Solonetzböden Eisenreduktion einsetzt, im Bereich von rH = 17 - 19. Bei rH-Werten kleiner als 17 stieg die Eisenreduktion mit den Symptomen der Vergleyung sprunghaft an; die Reduktionsintensität bei den im Labor durchgeführten Versuchen war somit deutlich stärker als die Grenzwerte am Profil. In den Laboratoriumsversuchen traten die ersten Vergleyungserscheinungen schon nach einer Woche auf. Dabei schien das visuelle Vergleyungsbild art-spezifisch zu sein. Ähnliche Vergleyungserscheinungen an inkubierten, künstlich überfluteten Bodenproben wurden schon wiederholt beobachtet (ALLISON und SCARSETH, 1942; BLOOMFIELD, 1950; BETREMIEUX, 1951; McKEAGUE, 1965 und ROHMER, 1966). Bis heute wurde jedoch kein Nachweis erbracht, daß bestimmte Organismen für die Vergleyung verantwortlich zu machen sind, obwohl die Beteiligung von Mikroorganismen immer wieder vermutet wurde. So traten in den Modellversuchen von ROHMER (1966) mit stark feuchtem, verdichtetem Löß ebenfalls nach 5 Tagen die ersten türkisgrünen Reduktionsflecken auf, später auch weniger scharf umrissene graue Zonen. Auch hier könnten mehrere Bakterienarten beteiligt gewesen sein. Es ist somit erwiesen, daß Eisenreduktion und Vergleyung einerseits und ubiquitäre Bakterien andererseits ursächlich zusammenhängen können.

4. Welche ökologischen Bedingungen müssen erfüllt sein, um eine Vergleyung zu ermöglichen ?

Nach der Gleichung

$$(\text{Fe}^{2+}) = K_o \cdot \frac{(\text{H}^+)}{(\text{O}_2)^{1/4}}$$

welche STARKEY und HALVORSON ableiteten (S. 18), ist die Konzentration an Eisen(II)-Ionen abhängig von der Reaktion und vom Sauerstoff-Partialdruck des Milieus. Diese Ableitung ist jedoch das Ergebnis ökologischer Betrachtungen. Vom Standpunkt des Physiologen muß jedoch betont werden, daß die Reduktion von Fe^{3+} zu Fe^{2+} einen endergonischen Vorgang darstellt ($\Delta F > 0$), der Energie (ein Elektron je Fe^{3+} Atom) benötigt. Ist ein energielieferndes (Bio)-System vorhanden, so kommt es trotzdem nicht zur Eisenreduktion, solange Sauerstoff oder Nitrate dem System zufließen, denn Sauerstoff und Nitrat werden im Boden erfahrungsgemäß eher reduziert als Eisenoxid (Tab. 1, S. 12). Infolgedessen ist die Vorbedingung für die Entstehung von Vergleyungsprozessen die Unterbindung des freien Zutritts von Sauerstoff, wie z.B. das nach Wassersättigung der Fall ist. Als Ursache der Eisenreduktion kann jedoch nur ein solches System in Betracht kommen, daß als Energiedonator fungieren kann. Das Ausmaß der Vergleyung ist jedoch von den herrschenden Standortfaktoren bedingt. Schon frühzeitig wurde die Anwesenheit von organischer Substanz für das Reduktionsausmaß als notwendig erkannt (S. 10). Aber auch die Konzentration des Nitrats (PONNAMPE-RUMA et al, 1964) sowie die Kristallisationsform der Eisenoxide (McKEAGUE, 1965) hatten einen meßbaren Einfluß auf den Umfang der Eisenreduktion im Boden. Diese Befunde lassen sich nunmehr unter Berücksichtigung eigener Versuchsergebnisse leichter deuten:

1. Im allgemeinen ist das Ausmaß der Eisenreduktion durch gewisse Bakterien um so stärker, je besser die Versorgung mit Vitaminen und Wirkstoffen ist.
2. In Anwesenheit von Nitrat (bzw. Chlorat) wird das Ausmaß der Eisenreduktion verringert.
3. Je weiter der Alterungsprozeß der Eisenoxide fortgeschritten ist, um so schwerer ist die Transformation des Fe^{3+} zum Fe^{2+} .
4. Unter ursprünglich sauren Bedingungen ist die Eisenreduktion geringer als bei neutralen oder alkalischen Verhältnissen im Milieu.

Es ist zu verstehen, daß die Möglichkeit der Vergleyung und seine Intensität von Fall zu Fall verschieden sein muß. Global betrachtet, könnte postuliert werden, daß ein alter, eisenoxidreicher, saurer und nährstoffarmer Boden nach einer Wassersättigung langsamer und geringfügiger vergleyt wird als ein juveniler, gut gepufferter, nitratfreier Boden von neutraler bis alkalischer Reaktion. Diese Hypo-

diese kann teilweise von einigen Feldbeobachtungen bodenkundlicher Art bestätigt werden. So wären z.B. die Versuchsergebnisse von PONNAMPERUMA et al. (1964) jetzt ursächlich plausibel. Diese Forscher berichteten, daß wassergesättigte Bodenproben, die eisenoxidreich und nitrathaltig waren, eine geringere Eisenreduktion und ein schwächeres Absinken des Redoxpotentials erbrachten als Proben, die kein Nitrat und wenig Eisenoxid enthielten. Aber auch die Unterdrückung der Eisenreduktion in Reisböden, die eine starke Nitratdüngung bekommen hatten (vgl. ALEXANDER, 1964) leuchtet jetzt vom Gesichtspunkt des Bodenbiologen ein. Weiter berichteten auch PONNAMPERUMA und Mitarb. (1967) von einer deutlich stärkeren Vergleyung bei ursprünglich alkalischen Boden im Vergleich zu saurem Ausgangsmaterial. Zu dem gleichen Ergebnis kam auch SIUTA (1960) mit künstlich überfluteten Böden im Labor. Zu der grün-grauen Verfärbung kam es nur in den neutralen bis basischen Proben, aber nicht bei den sauren Böden. Wurde das Stauwasser in einer Art Perkulationsverfahren abgelassen und stets erneuert, so führte dieser Vorgang bei den sauren Böden zu einer Art Naßbleichung. Diese Beobachtung unterstützt die Bedeutung der Reaktion der Bodenlösung für die Mobilität des reduzierten Eisens (S. 19). Die Unterschiede in der Prägung der reduzierten Horizonte von pseudovergleyten- und vergleyten Bodenzonen wären möglicherweise unter Berücksichtigung örtlicher Faktoren zu deuten.

5. Welcher physiologische Mechanismus ist für die Eisenreduktion verantwortlich ?

Der Reduktion von Eisen(III)-Verbindungen durch mikrobielle Tätigkeit können grundsätzlich zweierlei Mechanismen zugrunde liegen, und zwar kann er

1. unphysiologischer Natur, und die Eisenreduktion nur die Folge mikrobiellen Stoffwechsels sein (z.B. Säurebildung, H_2S oder H_2 -Bildung bzw. Ausscheidung reduzierender Substanzen), oder
2. physiologisch bedingt und die Reduktion des Eisens mit einem bestimmten Stoffwechselvorgang verbunden sein.

Eisenreduktion als Folgeerscheinung von H_2 , H_2S oder Säurebildung kommt nicht in Frage, weil jeweils die eisenreduzierende Flora der Bazillen, Enterobakterien, Clostridien und organischen-schwefelabbauenden Bakterien nicht mit dem gas- bzw. säurebildenden Anteil parallel ging. Außerdem besaß keiner der in Reinkultur als eisenreduzierend isolierten Stämme das Enzym Hydrogenlyase (H_2 und

CO₂-Bildung), und die Bildung von H₂S konnte nur bei einem einzigen Bakterium nachgewiesen werden. Weiter war auch zwischen pH-Endwert der Kulturen und dem Ausmaß der Eisenreduktion keine Beziehung feststellbar. Auch die Vermutung, daß gewisse reduzierende Substanzen bakteriellen Ursprungs beteiligt sind, konnte nicht bestätigt werden. Eisenreduktion als eine unphysiologische, zufällige Folgereaktion bakterieller Tätigkeit wäre somit auszuschließen. Demgegenüber sprechen die Versuchsergebnisse vielmehr für die Rolle des Eisen(III) als Wasserstoff-Endakzeptor der biologischen Oxydation, d.h. sie sprechen für eine zweckerfüllende, physiologische Funktion, wie im folgenden zu zeigen sein wird.

a. Der Dualismus der bakteriellen Eisenreduktion

Es gibt mehrere Beobachtungen, die für die Theorie der enzymatischen Eisenreduktion sprechen:

1. Nitrat sowie Chlorat verhalten sich als kompetitive Inhibitoren der Eisenreduktion, vorausgesetzt, der betreffende Organismus verfügt über das Enzym Nitrat-Reduktase;

2. nit⁻ Phänotypen von ursprünglich eisenreduzierenden Bakterien verfügen nur noch über einen geringen Teil ihrer Kapazität zur Eisenreduktion und

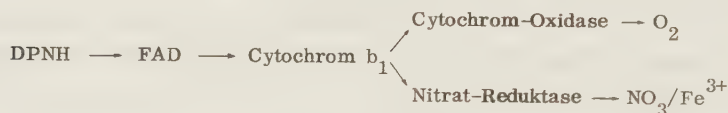
3. insgesamt 68 der 71 eisenreduzierenden Bakterien, die aus unterschiedlich vergleyten Zonen isoliert wurden, verfügten über das Enzym Nitrat-Reduktase.

Diese Befunde unterstützen die Hypothese der enzymatischen Nitratreduktion, in der das Enzym Nitrat-Reduktase als Hauptmechanismus der Eisenreduktion zu betrachten ist. Daneben muß aber noch mindestens ein anderer Mechanismus bei den zur Eisenreduktion befähigten Bakterien vorliegen, der bei den Nitrat-Reduktase freien Organismen (B. pumilus, B. sphaericus sowie 3 nit⁻ Phänotypen von Ps. fluorescens) die Eisenreduktion ermöglicht. Auch bei den N₂-bindenden Clostridien muß noch ein unbekannter Mechanismus vorliegen, da keiner der in Bergey's Manual (1957) beschriebenen N₂-bindenden Arten über das Enzym Nitrat-Reduktase verfügt. Ob dieser Mechanismus enzymatischer Natur ist, kann noch nicht gesagt werden, weitere Untersuchungen sind notwendig.

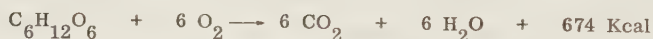
b. Die Thermochemie der Eisenreduktion

Die Frage, warum die Organismen zunächst Nitrat und dann erst Eisen(III)-Ver-

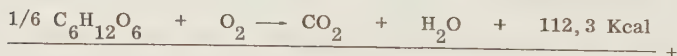
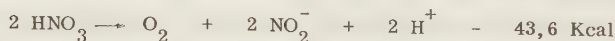
bindungen reduzieren, obwohl letztere im Boden weitaus häufiger vertreten sind, erfordert eine thermochemische Erläuterung. Ein Reduktionsvorgang verläuft, aus thermochemischem Gesichtspunkt gesehen, endotherm. Im Mikroorganismus entstammt die Energie der biologischen Oxydation energiereicher Verbindungen. Unter aeroben Verhältnissen wird der dehydrierte Wasserstoff über ein System von Coenzymen (DPNH, Flavoproteine) und Cytochromen zum Zwecke der Energiegewinnung (ATP-Bildung) auf den Endakzeptor Sauerstoff übertragen, der zu Wasser reduziert wird. Fehlt nun in der direkten Umgebung der freie Sauerstoff, so dient das Nitrat bei solchen Organismen, die über das Enzym Nitrat-Reduktase verfügen, als Wasserstoffakzeptor (NASON, 1960).



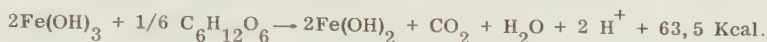
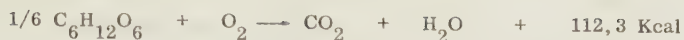
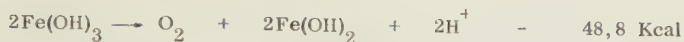
Dabei bezweckt die Nitratreduktion den Ausgleich der Wasserstoffbilanz durch Reoxydation der reduzierten Coenzyme, Träger der Energie-Transportkette, und der Gewinnung von ATP. Ist das Nitrat verbraucht, so dient das Fe^{3+} als Endakzeptor. Warum bevorzugt Nitrat reduziert wird, ergibt eine Betrachtung der energetischen Vorgänge. Bei der energetischen Verwertung von Glucose findet folgende Reaktion statt:



demnach entstehen auf 1 Mol O_2 etwa 112,3 Kcal. Nach MÜLLER (1965) werden zur Reduktion von 1 Mol NO_3^- etwa 22,8 Kcal benötigt, und die Bilanz ergibt:



Anhand des amorphen $\text{Fe}(\text{OH})_3$ kann auch die Reduktion des Fe^{3+} in einer Energie-Bilanz dargelegt werden. Die Wärmetönung der Bildung von $\text{Fe}(\text{OH})_3$ wurde von PONNAMPERUMA, MARTINEZ und LOY (1966) errechnet; $\Delta F = -24,4 \text{ Kcal/Mol}$, und ergibt folgende Bilanz:



Ein Vergleich beider Bilanzen ergibt, daß die Reduktion des Nitrats einen geringeren thermochemischen Aufwand an Energie fordert als die Eisenreduktion am Beispiel des Fe(OH)_3 . Dazu kommt aber noch, daß der Energieaufwand bei zunehmender Kristallisation der Eisenoxide höher wird, und der Reduktions-Prozeß in physiologischer Hinsicht ungünstiger verlaufen muß. Diese energetischen Bilanzen geben den Verlauf der Nitratreduktion bzw. Eisenreduktion in quantitativer Hinsicht nur annähernd wieder. In beiden Prozessen erfüllen Nitrat und Eisen(III)-Oxid die Rolle eines Wasserstoffakzeptors. In dieser Hinsicht sind die aufgeführten Gleichungen irreführend, weil sie zum Zwecke der Erläuterung als Sauerstoffdonatoren aufgefaßt worden sind. Man kann aber auch MÜLLER (1965) nicht zustimmen, wenn er die Meinung vertritt: "Die nitratreduzierenden Bakterien verwenden den auf dem Wege der Anaerobiose freigewordenen Sauerstoff als Energiequelle ... indem sie damit die organischen Verbindungen oxydieren". Elektrochemisch betrachtet ist die Reduktion eine Aufnahme von Elektronen (Energieform) und nicht eine Abgabe von Sauerstoff. Der "Sauerstoffgehalt" einer Verbindung ist nur ein Ausdruck ihres Energiezustandes.

c. Eisenreduktion als anaerobe Atmung

Biochemisch exakter könnte man sich das Wesen der Eisenreduktion folgendermaßen vorstellen:



Unter aeroben Bedingungen kommt es nicht zur Nitrat- bzw. Eisenreduktion, da O_2 einmal die Bildung des Enzyms Nitrat-Reduktase, zum anderen seine Wirkung unterdrückt (PICHINOTY, 1965). Der Reduktionsvorgang tritt nur dann auf, wenn aufgrund abnehmenden Sauerstoffpartialdrucks der Nitrat-Reduktase-Weg benutzt

wird, und andere oxidierte Verbindungen wie Perchlorat, Chlorat, Nitrat und Eisen(III) als Endakzeptor benutzt werden. Andererseits wurde festgestellt, daß auch strikt anaerobe Bedingungen das Ausmaß der Eisenreduktion stark herabsetzen. Am besten wäre demnach die Eisenreduktion durch Bakterien als eine anaerobe Atmung zu charakterisieren, d.h. ein vorwiegend aerober Stoffwechsel, der anorganische, oxidierte Verbindungen als Wasserstoffakzeptor benutzen kann. Die Bezeichnung "Metafermentation" würde diesen Vorgang in seinem Wesen erfassen und wurde schon für den Prozeß der Nitratreduktion geprägt (vgl. McLAREN und PETERSON, 1967). Diese Vorstellung wird noch besonders dadurch gestützt, daß

1. alle eisenreduzierenden Enterobakterien, sowie die meisten Bazillen und Pseudomonaden fermentativ bzw. fakultativ anaerob (mikroaerophil) sind und Nitrat reduzieren;
2. die Eisenreduktion im Boden direkt nach der Überflutung am stärksten ist (vgl. S. 9), solange noch organische Substanz und oxidierte Verbindungen als Akzeptoren vorhanden sind.

d. Hypothese für den Mechanismus der Eisenreduktion im Boden

Der isoelektrische Punkt der meisten Eisenoxide des Bodens liegt im pH-Bereich um 6. Mit fortschreitender Alterung und Kristallisation nimmt aber dieser pH-Wert ab, so daß der Kationenaustausch ansteigen müßte, wenn nicht die relative Oberfläche durch die fortschreitende Kristallisation kontinuierlich vermindert wurde (SCHEFFER und SCHACHTSCHABEL, 1960). Somit ist im allgemeinen das Verhältnis der positiven und negativen Ladungen der Eisenoxide unterhalb der Reaktion von $\text{pH} = 6,0$ relativ konstant, während oberhalb dieses Bereiches eine Verschiebung zugunsten der negativen Ladungen stattfindet. Die Oberflächenreaktion in wässriger Lösung ist nach PARKS und DE BRUYN (1962) in Abb. 12 für Hämatit dargestellt. Die Entstehung der Ladungsverhältnisse an der Oberfläche muß entweder als eine Adsorption von H^+ und OH^- Ionen gesehen werden, oder als eine Dissoziation der Ladungskomponenten selbst. Die Experimente ergaben, je alkalischer das Milieu und je geringer der Kristallisationsgrad, umso stärker war die Eisenreduktion pro Energiemenge. Im Hinblick auf diese Tatsachen, darf angenommen werden, daß die reaktionsfähige Oberfläche dabei am größten und die negative Ladung am stärksten war.

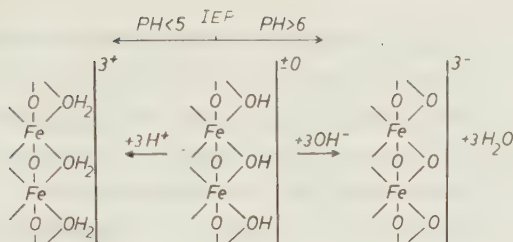


Abb. 12: Oberflächenreaktion von Hämatit in Abhängigkeit der Reaktion im Milieu.

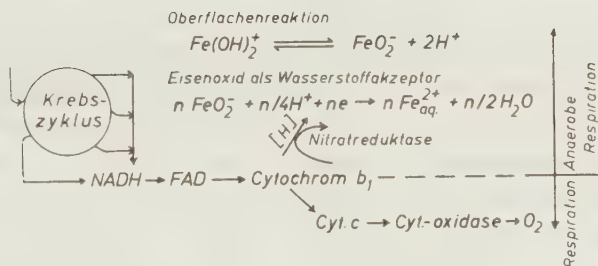


Abb. 13: Hypothese der enzymatischen Eisenreduktion durch Bakterien

Infolgedessen wird die Enzym-Substratbindung zwischen Eisenoxid und Nitrat-Reduktase ($E + S \rightarrow ES$) am intensivsten sein, weil - in Analogie mit der NO_3^- -Reduktion - die Umsatzgeschwindigkeit dieses Enzyms im alkalischen Bereich am größten ist (BREMNER und SHAW, 1958). Dieser hypothetische Vorgang ist in Abb. 13 schematisch dargestellt.

Zusammenfassung

Im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit stand die Frage nach dem ursächlichen Zusammenhang zwischen Eisenreduktion bzw. Vergleyung einerseits, und Mikroflora des Bodens andererseits. Es galt nachzuweisen, daß 1. eisenreduzierende Mikroorganismen ubiquitär vorkommen. Zum Versuchsobjekt wurden dazu eine Pseudogley-Braunerde, ein Pseudogley und ein Gley herangezogen. 2. Reinkulturen von eisenreduzierenden Bakterien, die in einen wassergesättigten, sterilen Boden eingimpft wurden, zur Eisenreduktion und Vergleyung befähigt sind.

1. Zur Charakterisierung der Versuchsböden und zur Differenzierung zwischen Pseudovergleyung und Vergleyung eignet sich die Benutzung des Vergleyungsindex

$$\frac{\text{Fe}_r}{\text{Fe}_d - \text{Fe}_o}$$

wesentlich besser als der Aktivitätsgrad Fe_o/Fe_d . Aufgrund dieses Vergleyungsindex gelang es zwischen dem S_w -Horizont der Pseudogley-Braunerde, dem S_d -Horizont des Pseudogleys und dem G_r -Horizont eines Gleyes in Bezug auf deren Pedogenese zu differenzieren. Der Vergleyungsindex hat gegenüber dem Aktivitätsgrad den Vorteil, drei Parameter des aktuellen Zustandes im wichtigsten anorganischen System gleichzeitig zu erfassen.

2. In jedem untersuchten Bodentyp, sowie in den aufbauenden Horizonten, war eine große Anzahl fakultativ und obligat anaerober Bakterien nachzuweisen, die zur Reduktion von Hämatit befähigt sind. Ihr Vorkommen war unabhängig davon, ob eine Vergleyung erkennbar war oder nicht. Wie üblich bei den Bakterien des Bodens, verringerte sich die eisenreduzierende Population mit zunehmender Bodentiefe von etwa einer Million je g trockenen Oberbodens auf rund Zehn- bis Hunderttausend in den von Staunässen beeinflussten Zonen.

3. Eine Differenzierung der Flora ergab, daß die fakultativ anaerobe, eisenreduzierende Gesamtflora zum größten Teil aus Vertretern der Enterobacteriaceae (Coli-Aerobacter Gruppe) und der Bacillaceae bestand. Die obligat anaerobe Flora umfaßte die luftstickstoffbindenden Clostridien sowie die sulfatreduzierenden Bakterien. Alle sind ubiquitär-vorkommende Organismen.

4. Die Bestimmung von eisenreduzierenden Bakterien aus dem S_w^- , S_d und G_r -Horizont ergab neben einer großen Anzahl von Bazillen auch Pseudomonaden, die zur Eisenreduktion befähigt waren. Die Identifizierung dieser Bakterien ergab folgende Spezies: Pseudomonas denitrificans, Ps. stutzeri, Ps. fluorescens, Ps. putida, Ps. desmolytica und Ps. aeruginosa. Weiter die Bacillus cereus, B. cereus var. mycoides, B. subtilis, B. firmus sowie zwei Vertreter der Gattung Arthrobacter. Alle sind ubiquitäre Bodenbewohner. Insgesamt 68 der 71 isolierten eisenreduzierenden Stämme verfügten über das Enzym Nitrat-Reduktase.

5. Die qualitative Prüfung der Eisenreduktion unter künstlichen Anzuchtbedingungen einer Reihe von Enterobakterien, Bazillen und anderen Bakterien erbrachte zusätzlich eine Fülle von eisenreduzierenden Bakterien: Aerobacter aerogenes, A. cloacae, Citrobacter freundii, Escherichia coli, Paracolonobactrum aerogenoides, Serratia marcescens, Bacillus alvei, B. cereus, B. cereus var. mycoides, B. circulans, B. mesentericus, B. megaterium, B. polymyxa, B. pumilus, B. subtilis, B. thurigiensis, Pseudomonas aeruginosa sowie Micrococcus roseus. Alle kommen im Wasser und im Boden vor.

6. Schimmelpilze wurden in dem G_r -Horizont nicht gefunden, Actinomyceten dagegen zahlreich. Von den geprüften Actinomyceten war keiner zur Eisenreduktion befähigt, im Gegensatz dazu Pilze der Gattung Fusarium (Nitrat-Reduktase positiv). Bodenalgae wurden ebenfalls in den pseudovergleyten und vergleyten Zonen nachgewiesen. Vermutlich sind sie mit dem Sickerwasser eingewaschen.

7. Die Organismen Aerobacter aerogenes, A. cloacae, Bacillus polymyxa und B. circulans sind in der Lage, in Reinkultur in Anwesenheit einer Energiequelle in einem sterilen Boden bei Wassersättigung Eisenreduktion und Vergleyungserscheinungen hervorzurufen. Dabei kam es zu einem starken Anstieg der Reduktionsintensität (rH), in dem Reaktion und Redoxpotential (Eh) im Boden stark abfielen. Zwischen rH und Ausmaß der Eisenreduktion ließen sich keine Beziehungen nachweisen. Die Art der Vergleyung schien artspezifisch zu sein.

8. Die quantitative Bestimmung der Kapazität der Eisenreduktion bei verschiedenen Mikroorganismen ergab, daß das Ausmaß unterschiedlich stark war. Am größten war sie bei Ps. aeruginosa und B. circulans (36° C). Die eisenreduzierende Kapazität war abhängig vom Vitamin- und Wirkstoffgehalt des Mediums,

von der Eisenoxidform und von der Ausgangsreaktion des Milieus. Im allgemeinen war im neutralen bis alkalischen Bereich die Eisenreduktion größer als im sauren. Das Ausmaß der Eisenreduktion nahm mit zunehmender Kristallinität der Eisenoxide ab; sie war am größten beim amorphen $\text{Fe}(\text{OH})_3$, und am geringsten beim Hämatit.

9. Physiologische Untersuchungen erbrachten den Nachweis, daß Eisenreduktion und Nitrat-Reduktion vom gleichen Enzym Nitrat-Reduktase bewirkt wurde. Eisen(III) und Nitrat sind kompetitive Enzymsubstrate, von denen Nitrat aufgrund des geringeren thermochemischen Energiebedarfs als Wasserstoffakzeptor bevorzugt wird.

10. Dem Vorgang der bakteriellen Eisenreduktion liegen zumindest 2 verschiedene biochemische Mechanismen zugrunde. Dieses Ergebnis stützte sich auf zwei Beobachtungen: 1. verfügen nicht alle zur Eisenreduktion befähigten Bakterien über das Enzym Nitrat-Reduktase; und 2. nit^- Mutanten eisenreduzierender Bakterien reduzierten zwar weniger Eisen, hatten jedoch diese Fähigkeit nicht vollständig verloren.

11. Der Zweck der Eisenreduktion für die Mikroorganismen besteht wahrscheinlich darin, unter verringertem Sauerstoffpartialdruck die Eisenoxide als Wasserstoffakzeptoren ihrer respiratorischen Stoffwechselleistungen verwenden zu können. Der Vorgang der Eisenreduktion wäre seinem Wesen nach als "anaerobe Respiration" oder "Metafermentation" zu charakterisieren. Eine Hypothese der Eisenreduktion im Boden wurde aufgestellt.

Summary

In order to explain the worldwide phenomenon in soils, known as gleying, the existence of iron-reducing, ubiquitously distributed bacteria should be assumed. In the study presented, the quantitative and qualitative distribution of bacteria, capable of reducing iron, were examined in three different gleyed soils. If such bacteria should be regarded responsible for the gleying features, they ought to be capable of reproducing similar characteristics, when inoculated in pure culture into a sterile clay soil under waterlogged conditions. Finally, physiological studies on the mechanism of iron-reduction were conducted.

Evaluating iron-reducing bacteria by the method of MPN (OTTOW, 1968), a great number of facultative and obligat anaerobic bacteria, capable of reducing iron, could be detected in every horizon, independently whether gleying had occurred or not (OTTOW, 1969). In top soil, a population of more than one million iron-reducing, facultative anaerobic bacteria were estimated (MPN) per g oven-dried soil. Their number decreased with the depth of the profiles, but still as many a 10 to 100 thousand viable counts per gram gleyed soil had the capacity to reduce iron oxide. Among the obligate anaerobic bacteria, the nitrogen-fixing clostridia were most active in reducing iron oxide. Even these anaerobic bacteria decreased with increasing soil depth from more than 10 thousand in top soil to only a few thousands in the gleyed zones.

Among the facultative anaerobic, iron-reducing bacteria, at least 3 different groups could be recognized: 1. lactose-fermenting Enterobacteriaceae (Coli-Aerobacter group), 2. common representatives of the genus Bacillus. In each horizon these 2 groups accounted only for a part of the total iron-reducing population (MPN), suggesting the participation of at least one other group of bacteria, capable of reducing iron compounds. This hypothesis could be confirmed by the identification of iron-reducing bacteria, isolated from gleyed horizons. Except for bacilli, a great number of Pseudomonas sp. were obtained. Predominant among these iron-reducing bacteria, isolated from waterlogged zones, were: Bacillus cereus, B. cereus var. mycoides, B. subtilis, and B. firmus as well as Ps. denitrificans, Ps. stutzeri, Ps. fluorescens and Ps. putida. Among these 71 isolated strains, all except 3 possessed the nitrate-reducing ability. This

property strongly supported the significance of this enzyme for the iron-reducing ability.

When testing a variety of common soil bacteria, molds, actinomycetes and yeasts in pure culture on their iron-reducing ability, the predominance of this property was verified among enterobacteria, bacilli as well as among pseudomonads, as listed in table 15. All these iron-reducing bacteria are widely distributed in nature.

After inoculating 4 of these bacteria (Aerobacter aerogenes, A. cloacae, Bacillus polymyxa, and B. circulans) into a sterilized, submerged clay soil with sucrose as an energy source, iron-reduction as well as gleying occurred within a week. Eh and pH decreased while increasing simultaneously the reduction-intensity (rH) of the environment. No relationship between dissolved ferrous iron and the rH-level could be detected. However, the rH established was considerably stronger as those reported in natural gleyed soils. The pattern of gleying seemed to be rather specific for each organism tested.

In opposit to numerous iron-reducing bacteria, only two Fusarium sp., some yeasts but no actinomycetes, were able to convert ferric iron to the ferrous state in the media used. The significance of fungi in the process of gleying seems to be doubtful, since no fungi, but many actinomycetes could be detected in typically gleyed zones (OTTOW and GLATHE, 1968).

Quantitative studies on the iron-reducing capacity of several iron-reducing bacteria revealed that

1. the iron-reducing capacity differed greatly among the bacteria tested. In addition, growth factors of soil extract, vitamins and nitrate had a marked effect on the amount of dissolved iron. Generally spoken, Bacillus circulans reduced most iron in vitamin-enriched media, whereas Pseudomonas aeruginosa and Paracolobactrum aerogenoides were most active in a synthetic medium.
2. Under aerobic conditions, more iron became reduced as under strict anaerobic conditions, thus excluding iron-reduction as an anaerobic process.
3. The iron-reducing capacity increased with raising alkalinity of the medium,

but decreased with proceeding cristallization: hydrated ferric oxide > Lepidocrocite > Goethite > Hematite

4. Increasing the amount of nitrate or chlorate to the medium, the amount of iron reduced was decreased proportionally, provided the enzyme nitrate-reductase was present. Sulphate had no influence on the iron-reducing capacity (OTTOW, 1968).

The results reported in item 4 suggested ferric iron, nitrate and chlorate to be alternative, competitive substrates of the enzyme nitrate-reductase. To determine whether iron-reduction was indeed physiologically linked to the enzyme nitrate-reductase, nit^- mutants of originally iron-reducing bacteria were selected and tested quantitatively on their iron-reducing capacity. Though the iron-reducing capacity of these nit^- phenotypes was reduced distinctly, it could not be suppressed. This suggested the presence of at least two iron-reducing mechanisms in these organisms.

This study has shown that the reduction of iron-oxides is not caused only by Bacillus polymyxa as suggested by ROBERTS (1947), or by B. circulans, Aerobacter aerogenes or Citrobacter freundii, as indicated by BROMFIELD (1954a), but rather is an attribute of a great variety of ubiquitously occurring soil bacteria. During the reduction process, ferric iron may be regarded as a final electron acceptor for many aerobic organism in a manner similar to nitrate reduction. Under waterlogged conditions the exclusion of free oxygen force these bacteria to use other ultimate electron acceptors such as nitrate, ferric oxide and manganous compounds to enable their intermediary metabolism. Iron-reduction and gleying in soil should at least in part be regarded as interdependent, bacteriological processes.

Literaturverzeichnis

- ADHYA, S., P.P. CLEARY and A. CAMPBELL: Nitrate reductase mutants of Escherichia coli. Bact. Proc. p.55 (1968)
- AGUILERA, N.H. and M.L. JACKSON: Iron oxide removal from soils and clays. Proc. Soil Sci. Soc. Amer. 17, 359-364 (1953)
- AHRENS, E.: Herstellung eines Hafer-Nährbodens für die Zählung und Züchtung von Actinomyceten. Bodenbiol. Intern Mitteilbl. 7, 20-21 (1967)
- ALBRECHT, W.A.: Calcium saturation and anaerobic bacteria as possible factors in gleization. Soil Sci. 51, 213-220 (1941)
- ALEXANDER, M.: Biochemical ecology of soil microorganisms. Ann. Rev. Microbiol. 18, 217-252 (1964)
- ALLISON, L.E. and G.D. SCARSETH: A biological reduction method for removing free iron oxide from soil and colloidal clays. J. Amer. Soc. Agron. 34, 616-630 (1942)
- AOMINE, S.: A review of researches on redox potentials of paddy soils in Japan. Soil Sci. 94, 6-13 (1962)
- ARDEN, T.V.: The solubility products of ferrous and ferrosic hydroxides. J. Chem. Soc. 1, 882-885 (1950)
- ARISTOVSKAYA, T.V.: The decomposition of fulvic acids by microorganisms. Soviet Soil Sci. 2, 1224-1233 (1958)
- AUGIER, J.: A propos de la fixation biologique de l'azote atmosphérique et de la numération des Clostridium fixateurs dans les sols. Ann. Inst. Pasteur 92, 817-824 (1957)
- VERY, B.W.: Classification of British soils. 6th Intern. Congr. Soil Sci. Vol. E, P. 279, Paris (1956)
- BAGASARYAN, E.G.: The formation of vitamine B₁₂ by soil bacteria. Mikrobiologija 34, 502-505 (1965); engl. Übersetz.
- BALKS, R. und I. REEKERS: Bestimmung des Nitrat- und Ammoniakstickstoffs im Boden. Landw. Forsch. 8, 7-13 (1955)
- BARJAC, H. de et J. POCHON: Appréciation de la microflore tellurique anaérobie active sur la soufre organique. Ann. Inst. Pasteur 89, 591-593 (1955)

- BERGEY' Manual of Determinative Bacteriology; editors:
BREED, R.S., E.G.D. MURRAY and N.R. SMITH.
Williams and Wilkins, Baltimore, 7th ed. (1957)
- BÉTRÉMIEUX, R.: Etude expérimentale de l'évolution du fer et du manganèse dans les sols. Ann. Agron. 2, 193-295 (1951)
- BLAZEVIC, D.J.: Improved motility-indole medium.
Appl. Microbiol. 16, 668 (1968)
- BLOOMFIELD, C.: Experimente on the mechanism of gley formation.
J. Soil Sci. 2, 196-211 (1951)
- BLOOMFIELD, C.: A study on podzolization. The mobilization of iron and aluminium by the leaves and bark of Agathis australis. J. Soil Sci. 4, 17-23 (1953)
- BLOOMFIELD, C.: Some observations on gleying. J. Soil Sci. 1, 205-213 (1950)
- BLÜMEL, F.: Formen der Eisenoxydhydrat-Ausscheidungen in Gleyen und Pseudogleyen. Z. Pflanzenern. Bodenk. 98, 258-264 (1962)
- BLUME, H.P.: Zum Mechanismus der Marmorierung und Konkretionsbildung in Stauwasserböden. Z. Pflanzenern. Bodenk. 119, 124-134 (1968)
- BREMNER, J.M. and K. SHAW: Denitrification in soil. II. Factors affecting denitrification. J. Agric. Sci. 51, 40-51 (1958)
- BREMNER, J.M.: Magnesium oxide-Devarda alloy method for soil extracts. in: C.A. BLACKED: Methods of soil analysis II: Amer. Soc. Agron., p 1195-1200, Madison (1965)
- BROMFIELD, S.M.: The reduction of iron by bacteria.
J. Soil Sci. 5, 129-139 (1954a).
- BROMFIELD, S.M.: Reduction of ferric compounds by soil bacteria.
J. gen. Microbiol. 11, 1-6 (1954b)
- BROWN, G.: The occurrence of lepidocrocite in some British soils. J. Soil Sci. 4, 220-228 (1953)
- BROWN, G.: Soil morphology and mineralogy. A qualitative study of some gleyed soils from North-West England.
J. soil Sci. 5, 145-155 (1954)

- BRUCKERT, S. et Y. DOMMERGUES: Etude expérimentale de la biodégradation de deux complexes organo-ferriques dans un sol à mor et dans un sol à mull. Sci. du Sol. 2, 65-77 (1966)
- BRUCKERT, S. et F. JACQUIN: Relation entre l'évolution des acides hydrosolubles de deux litières forestières et les processus pédogénétiques. Bull. E.N.S.A. Nancy, 8, 95-112 (1966)
- CLARK, F.E.: Bacteria in soil. in: BURGESS, A. and F. RAW. Soil Biology. Acad. Press, London, p. 16-49 (1967)
- CLARK, F.E. and J.W. RESNICKY: Some mineral element levels in the soil solution of a submerged soil in relation to rate of organic matter addition and length of flooding. 6th Intern. Congr. Soil Sci. Paris, Vol. C, 545-548 (1956)
- COCHRAN, W.G.: Estimation of bacterial densities by means of the "Most probable number". Biometrics 6, 105-116 (1950)
- COCHRANE, V.W.: Physiology of actinomycetes. Ann. Rev. Microbiol. 15, 1-26 (1961)
- COLLINS, C.H.: Microbiological Methods. Butterworths, London, p. 135-141 (1964)
- CORKE, C.T. and F.E. CHASE: The selective enumeration of actinomycetes in the presence of large numbers of fungi. Canad. J. Microbiol. 2, 12-16 (1956)
- CRAWFORD, D.V.: Physico-chemical and biological aspects of podzolization. Intern. Soil Conf. N.Z. 230-234, (1962); Ref. Soil and Fert. 26, nr. 3016 (1963)
- DAVIS, B.D. and E.S. MINGIOLI: Mutants of Escherichia coli requiring methionine or vitamin B₁₂. J. Bact. 60, 17-28 (1950)
- DOMMERGUES, Y et P. DUCHAUFOR: Etude comparative de la dégradation biologique des complexes organoferriques dans quelques types de sols. Sci. du Sol. 1, 43-61 (1965)
- DUCHAUFOR, P.: Précis de pédologie. Edition Masson, Paris, (1965)
- DUCHAUFOR, P.: Sur le rôle de la matière organique dans les phénomènes de lessivage et de podsolisation. C.R. Acad. Sci. Paris, 245, 1154-1157 (1957)

- ELLIOT, R.P.: Some properties of pyoverdine, the watersoluble, fluorescent pigment of the pseudomonads. Appl. Microbiol. 199, 601-602 (1958)
- FEITKNECHT, W. und W. MICHAELIS: Über die Hydrolyse von Eisen(III)-perchlorat-Lösungen. Helv. Chim. Acta 45, 212-224 (1962)
- FLAIG, W., K. SCHARRER und G.K. JUDEL: Bestimmung des Redox-Potentials von Bodenprofilen. Z. Pflanzenern. Bodenk. 68, 203-217 (1955)
- GASTUCHE, M.C., T. BRUGGEWERT and M.M. MORTLAND: Crystallization of mixed iron and aluminium gels. Soil Sci. 98, 281-289 (1964)
- GEREI, L.: Eisenhaltige Konkretionen in verschiedenen ungarischen Böden. Chem. der Erde 19, 324-326 (1958)
- GLATHE, H. und E. AHRENS: Die Bestimmung des Azotobacter-Gehaltes in azotobacterhaltigen Substanzen. Landw. Forsch. 17, 172-178 (1963)
- GLATHE, H. und S.B. SINGH-VERMA: Glucose-Peptone Agar, ein geeigneter Nährboden für die Isolierung und Kultivierung der bakteriellen Antagonisten aus dem Boden sowie antibakterielle Wirkung einiger Bodenbakterien gegen andere apathogene bzw. pathogene Keime. Zbl. Bakt. II, 122, 4-21 (1968)
- GRECUSHKINA, N.N., K.A. NIKITINA und I.L. RABOTNOVA: Faktoren, die die Erniedrigung des Oxidation-Reduktionspotential in Kulturen sporenbildender aerober Bakterien bestimmen. Mikrobiologija 34, 200-204 (1965) Russ.
- HACKENTHAL, E., W. MANNHEIM, R. HACKENTHAL und R. BECHER: Die Reduktion von Perchlorat durch Bakterien. Biochem. Pharmacol. 13, 195-206 (1964)
- HARDER, E.C.: Iron depositing bacteria and their geologic relations. U.S. Geol. Surv. Prof. Paper, nr. 113, 89, (1919): zit. nach DOMMERGUES et DUCHAUFOUR (1965)
- HEM, J.D. and W.H. CROPPER: Chemistry of iron in natural water. A survey of ferrous-ferric chemical equilibria and redox-potentials. U.S. Geol. Survey Water Supply Paper 1459 A, 1-31 (1959)
- HEM, J.D.: Complexes of ferrous iron with tannic acid. U.S. Geol. Surv. Water Supply Paper 1459 D, 75-94 (1960)

- HENDRIE, M.S. and J.M. SHEWAN: The identification of certain *Pseudomonas* species. in: Gibbs, B.M. and F.A. Skinner. Identification methods for microbiologists. part. A, Acad. Press, London, p. 1-9 (1966)
- HENDRIE, M.S., T.G. MITCHELL and J.M. SHEWAN: The identification of yellow-pigmented rods. in: Identification methods for microbiologists. Acad. Press, London, part. B. p. 69-79 (1968)
- HEWITT, L.F.: Oxidation-reduction potentials in bacteriology and biochemistry. 6th ed., The Williams and Wilkins Co., Baltimore, p. 3-10, 29 (1950)
- HIRTE, W.: Glycerin-Pepton Agar, ein vorteilhafter Nährboden für bodenbakteriologische Arbeiten. Zbl. Bakt. II, 114, 141-146 (1961)
- HOSKINS, J.K.: Most probable numbers for evaluation of coli-Aerogenes tests by fermentation tube method. Publ. Health Rep. 49, 393-397 (1934)
- HUGH, R. and E. LEIFSON: The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various Gram-negative bacteria. J. Bact. 66, 24-26 (1953)
- IGNATIEFF, W.: Determination and behaviour of ferrous iron in soils. Soil Sci. 51, 249-265 (1941)
- IVES, D.J.G. and G.J. JANZ: Reference electrodes. Theory and practice. Acad. Press, New York, p. 240 (1961)
- JACKSON, M.L.: Soil chemical analysis. Prentice Hall. Inc., Englewood Cliffs, N.J., p. 390 (1958)
- JORDAN, J.H., W.H. PATRICK and W.H. WILLIS: Nitrate reduction by bacteria isolated from waterlogged Crowley soil. Soil Sci. 104, 129-133 (1967)
- JUSTE, C.: Contribution à l'étude de la dynamique de l'aluminium dans les sols acides du sud-ouest atlantique. Application à leur mise en valeur. Thèse Faculté des Sciences, Univ. Nancy (1965)
- KAMURA, T., Y. TAKAI and K. ISHIKAWA: Microbial reduction mechanism of ferric iron in paddy soils. Soil Sci. Plant Nutr. 9, 171-175 (1963)
- KARBACH, L.: Untersuchungen über den Einfluß der Bodenmikroorganismen auf die Redoxverhältnisse im Boden. Landw. Forsch. 14, 59-96 (1961)

- KING, E.O., M.K. WARD and D.E. RANEY: Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin.
J. Lab. Clin. Med. 44, 301-307 (1954)
- KLINGE, K.: Pseudomonas fluorescens, ein Boden- und Wasserkkeim I. Physiologie und Identifizierung.
Arch. Mikrobiol. 33, 1-25 (1959)
- KNIGHT, B.C.J.G. and H. PROOM: A comparative survey of the nutrition and physiology of mesophilic species in the genus Bacillus.
J. gen. Microbiol. 4, 508-537 (1950)
- KOVACS, N.: Identification of Pseudomonas pyocyanea by the oxidase reaction. Nature 128, 703 (1956)
- KRASSILNIKOV, N.A.: Diagnostik der Bakterien und Actinomyceten.
VEB. Fischer Verlag, Jena, S. 543-627 (1959)
- KUBIENA, W.L.: Bestimmungsbuch und Systematik der Böden Europas.
Enke Verlag, Stuttgart, (1953)
- KUCHNER, C.C. and G. MITROVICH: Effect of rosa bengal and light on the growth of Aspergillus niger.
Canad. J. Microbiol. 13, 27-30 (1967)
- LASKOWSKI, D. and J.T. MORAGHON: The effect of nitrate and nitrous oxide on hydrogen and methane accumulation in anaerobically incubated soils. Plant and Soil 27, 357-369 (1967)
- LEEPER, G.W.: The forms and reactions of manganese in the soil.
Soil Sci. 63, 79-88 (1947)
- LIEBERT, F.: Reduzieren Mikroben Phosphate? Zbl. Bakt. II, 72, 369-374 (1927)
- LIJK VAN RIESEN, V.: Hydrogen sulfide production by Pseudomonas aeruginosa. J. Bact. 85, 248-249 (1963)
- LINDER, A.: Statistische Methoden. Birkhäuser Verlag, Basel, S. 97-99 (1960)
- LOCHHEAD, A.G. and F.E. CHASE: Qualitative studies of soil microorganisms. V. Nutritional requirements of the predominant bacterial flora. Soil Sci. 55, 185-195 (1943)
- LOCHHEAD, A.G. and R.H. THEXTON: Qualitative studies of soil microorganisms. VII. The rhizosphere effect in relation to amino acid nutrition of bacteria.
Canad. J. Research. C, 25, 20-26 (1947)

- LOCHHEAD, A.G. and R.H. THEXTON: Qualitative studies of soil microorganisms. X. Bacteria requiring Vitamin B₁₂ as growth factors. J. Bact. 63, 219-225 (1952)
- LORD, T.H.: Determinative bacteriology. Burgess Publ. Co., Minneapolis (1959)
- LOSSAINT, P.: Etude expérimentale de la mobilisation du fer des sols sous l'influence des litières forestières. Ann. Agron. Paris, 10, 369-414 (1959)
- LOUB, W.: Die mikrobiologische Charakterisierung von Bodentypen. Bodenkultur A, 11, 38-70 (1960)
- LUDWIG, F.: Über die Eisenoxydhydrate im Boden unter besonderer Berücksichtigung des Einflusses auf den T-Wert der Tonminerale. Diss., Univ. Göttingen (1956)
- LUND, J.W.G.: Soil Algae. in: Soil Biology. Edited by A. Burges und F. Raw. Acad. Press. London, p. 129-142 (1967)
- MAGASANIK, B., M.S. BROOKE and D. KARIBIAN: Metabolic pathways of glycerol dissimulation. A comparative study of two strains of Aerobacter aerogenes. J. Bact. 66, 611-620 (1953)
- MANDEL, L.N.: Transformation of iron and maganese in waterlogged rice soils. Soil Sci. 91, 121-126 (1961)
- MATSUO, H., S. GOTOH, T. SAKURAI et al.: Realtionship in redox-potentials and changes in the system of iron and nitrate in paddy soils. Bull. Kyushu. Agric. Exp. Sta. 7, 325-333 (1962); Ref. Soil and Fert. 26, nr. 44 (1963)
- McKEAGUE, J.A.: A laboratory study of gleying. Canad. J. Soil Sci. 45, 199-206 (1965)
- McKEAGUE, J.A.: The fixation of Fe²⁺ by ferric oxides in soil. Canad. J. Soil Sci. 45/46, 91-92 (1966)
- McKEAGUE, J.A. and J.H. DAY: Dithionite and oxalate extractable iron and aluminium as aid in differentiating various classes of soils. Canad. J. Soil Sci. 46, 13-23 (1966)
- McKENZIE, L.J., E.P. WHITESIDE and A.E. ERICKSON: Oxidation-reduction studies on the mechanism of B horizon formation in podsols. Proc. Soil Sci. Soc. Amer. 24, 300-305 (1960)
- McLAREN, A.D. and G.H. PETERSON: Soil biochemistry. Marcel Dekker Inc., New York, p. 197-214 (1967)

- MICHOUSTIN, E.N.: La Science des Associations microbiennes du sol et son développement. VI Congr. Intern. Sci. Sol Paris, Vol. E, 145-150 (1956)
- MINDICH, L.: Pathway for oxidative dissimilation of glycerol in Bacillus subtilis. J. Bact. 96, 565-566 (1968)
- MITCHELL, R. and M. ALEXANDER: Microbiological changes in flooded soils. Soil Sci. 93, 413-419 (1962)
- Mitteilungen des Verbandes Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten. Nr. 4, 85 (1963)
- MORTIMER, C.H. and W.H. PEARSALL: Oxidation-reduction potentials in water-logged soils, natural waters and muds. J. Ecol. 27, 483-501 (1939)
- MOTOMURA, S.: Effect of organic matter on the formation of ferrous iron in soil. Soil Sci. Plant Nutr. 8, 20-29 (1962)
- MOTOMURA, S. and K. YAMANAKA: Gley formation in soils. Relationships between ferrous iron formation and nitrogen metabolism. J. Sci. Soil, Tokyo, 33, 391-396 (1963): Ref. Soil Sci. Plant Nutr. 9, 41, (1965)
- MÜCKENHAUSEN, E.: Entstehung, Eigenschaften und Systematik der Böden der Bundesrepublik Deutschland. DLG-Verlags-GMBH, Frankfurt/Main, S. 44 (1962)
- MÜLLER, G.: Bodenbiologie. Gustav Fischer Verlag, Jena, S. 470, 229, (1965)
- MÜLLER, J. und H. MELCHINGER: Methoden der Mikrobiologie. Franckh'sche Verlagshandlung, Stuttgart, S. 44 (1964)
- MUIR, J.W., MORRISON, R.I., J.C. BOWN et al.: The mobilization of iron by aqueous extracts of plants. J. Soil Sci. 15, 220-225 (1964)
- NASON, A.: Enzymatic pathways of nitrate, nitrite and hydroxylamine metabolisms. Bact. Rev. 26, 16-41 (1962)
- NEHRING, K.: Agrikulturchemische Untersuchungsmethoden für Dünge- und Futtermittel, Boden und Milch. Verlag P. Parey, Hamburg (1960)
- NG, S.K. and C. BLOOMFIELD: The effects of flooding and aeration on the mobility of certain trace elements in soil. Plant and Soil 16, 108-135 (1962)

- OADES, J.M.: The nature and distribution of iron compounds in soils. *Soils and Fertilizers* 26, 69-80 (1963)
- OTTOW, J.C.G.: Studies on the reduction-intensity (rH), iron-reducing capacity and gley formation of some facultative anaerobic bacteria. Master's Thesis, Kansas State University, Manhattan, (1966)
- OTTOW, J.C.G. and H. GLATHE: Rose bengal-malt extract agar, a simple medium for the simultaneous isolation and enumeration of fungi and actinomycetes from soil. *Appl. Microbiol.* 16, 170-171 (1968)
- OTTOW, J.C.G.: Evaluation of iron-reducing bacteria in soil and the physiological mechanism of iron-reduction in Aerobacter aerogenes. *Z. allg. Mikrobiol.* 8, 441-443 (1968)
- OTTOW, J.C.G.: The distribution and differentiation of iron-reducing bacteria in gley soils. *Zbl. Bakt.* II, (1969) im Druck.
- PARKS, G.A. und P.L. DE BRUYN: The zero point of charge of iron oxides. *J. Physical. Chem.* 66, 967-971 (1962)
- PICHINOTY, F.: Recherches sur la nitrate-réductase d'Aerobacter aerogenes. *Ann. Inst. Pasteur*, 104, 394-418 (1963)
- PICHINOTY, F.: L'inhibition par l'oxygène de la dénitrification bactérienne. *Ann. Inst. Pasteur*, suppl. au no. 3, 248-255 (1965)
- VON PLOTTH, O.: Beiträge zur Kenntnis der Morphologie und Physiologie der Actinomyceten. *Arch. Mikrobiol.* 11, 33-38 (1940)
- POCHON, J. et P. TARDIEUX: Techniques d'analyse en microbiologie du sol. Edit. de la Tourelle, Saint Mandé, p. 91-94 (1962)
- PONNAMPERUMA, F.N. and R.U. CASTRO: Redoxsystems in submerged soils. VIIIth Intern. Congr. Soil Sci. Bucharest, Vol. II, p. 107-109 (1964)
- PONNAMPERUMA, F.N., E. MARTINEZ and T. LOY: Influence of redox potential and partial pressure of carbon dioxide on pH values and the suspension effect of flooded soils. *Soil Sci.* 101, 421-431 (1966)
- PONNAMPERUMA, F.N., E.M. TIANCO and T. LOY: Redox equilibria in flooded soils. The iron hydroxide systems. *Soil Sci.* 103, 374-383 (1967)

- PONOMAREVA, N.S. and M.V. BAZILINSKAYA: Alteration of some properties of soils of a solonchaks complex of the wooded steppe of western Siberia under the influence of excessive moistening. Izv. Timiryazev. s.-Akad. 14, 130-137 (1964); Ref. Soil and Fert. 28, nr. 868 (1965)
- POSTGATE, J.R.: A strain of Desulfovibrio able to use oxamate. Arch. Mikrobiol. 46, 287-296 (1963)
- POSTGATE, J.R.: Recent advances in the study of the sulfate-reducing bacteria. Bact. Rev. 29, 425-436 (1965)
- PRINGSHEIM, E.G.: Iron bacteria. Biol. Rev. 24, 200-245 (1949)
- PUIG, J., E. AZOULAY et F. PICHINOTY: Etude génétique d'une mutation à effet pléiotropique chez l' Escherichia coli K12. C.R. Acad. Sci. Paris, 264, D, 1507-1509 (1967)
- PUIG, J. et E. AZOULAY: Etude génétique et biochimique des mutants résistants au ClO_3^- (gènes chl A, chl B, chl C). C.R. Acad. Sci. Paris, 264, D, 1916-1918 (1967)
- QUASTEL, J.H., M. STEPHENSON and M.D. WHETHAM: Some reactions of resting bacteria in relation to anaerobic growth. Biochem. J. 19, 304-309 (1925)
- RABOTNOVA, I.L.: The significance of pH and rH_2 for microorganisms. Sci. Repts. Ist. Super. Sanità 1, 423-426 (1961)
- RABOTNOVA, I.L.: Die Bedeutung physikalisch-chemischer Faktoren (pH und rH_2) für die Lebenstätigkeit der Mikroorganismen. Gustav Fischer Verlag, Jena, S. 22 (1963)
- RABOTNOVA, I.L., V.G. PLAKUNOVA, M.A. PALEEVA and L.V. SHENDEROVA: Reasons for the decrease in the redox-potential in cultures of microorganisms. Mikrobiologija 32, 954-961 (1963) Russ. mit engl. zusamm.
- REISENAUER, H.M., A.A. TABIKH and P.R. STOUT: Molybdenum reactions with soils and the hydrous oxides of iron, aluminium and titanium. Soil Sci. Soc. Am. Proc. 26, 23-27 (1962)
- RIEHM, H. und B. ULRICH: Quantitative kolorimetrische Bestimmung der organischen Substanz im Boden. Landw. Forsch. 6, 173-176 (1954)
- ROBERTS, J.L.: Reduction of ferric hydroxide by strains of Bacillus polymyxa. Soil Sci. 63, 135-141 (1947)

- ROBICHET, O.: Méthodes de dosage du fer. Annal. Agron. 8, 257-322 (1957); 511-572 (1957)
- RODRIGO, D.M. and A.G. POLLARD: Chemistry of waterlogged soils. Changes in oxidation-reduction potentials of two soils on submergence. Influence of pH and organic matter. J. Sci. Food Agric. 13, 43-48 (1962)
- ROHMER, W.: Modellversuche über die Eisenreduktion bei Verdichtung in umgelagerten Löß. Z. Pflanzenern. Bodenk. 114, 101-113 (1966)
- RUDAKOV, K.I.: Reduktion der mineralischen Phosphate auf biologischem Wege. Zbl. Bakt. II, 70, 202-214 (1927)
- RUSCHKE, R.: Über die Eigenschaften von 95 Pseudomonas fluorescens Stämmen aus dem Zufluß des Feldsees/Schwarzwald. Arch. Hydrobiol., Suppl. 23, 381-396 (1968)
- RUSCHKE, R. und K. KÖHN: Ein neuer Nährboden zum Erkennen von Fluoreszenten aufgrund der Farbstoffbildung. Zbl. Bakt. II, 122, 22-24 (1968)
- SAVANT, N.K. and E. ROSCOE: Changes in redox-potentials and phosphorus availability in submerged soil. Soil Sci. 14, 381-402 (1964)
- SCHACHTSCHABEL, P. und G. HEINEMANN: Beziehung zwischen P-Bindungsart und pH-Wert bei Lößböden. Z. Pflanzenern. Bodenk. 105, 1-13 (1964)
- SCHEFFER, F., E. WELTE und F. LUDWIEG: Zur Frage der Eisenoxidhydrate im Boden. Chem. der Erde 19, 51-65 (1958)
- SCHEFFER, F., und P. SCHACHTSCHABEL: Lehrbuch der Agrikulturchemie und Bodenkunde. Teil I Bodenkunde. Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart, S. 82 (1960)
- SHELLMANN, W.: Experimentelle Untersuchungen über die sedimentäre Bildung von Goethit und Hämatit. Chem. der Erde 20, 104-135 (1959)
- SCHLICHTING, E. und H.P. BLUME: Bodenkundliches Praktikum. Paul Parey Verlag, S. 106, 107 (1966)
- SCHNITZER, M. and S.I.M. SKINNER: Organo-metallic interactions in soils. VII. Stability constants of Ni^{2+} , Pb^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Ca^{2+} and Mg^{2+} fulvic acid complexes. Soil Sci. 4, 247-252 (1967)

- SCHOLZ-KÖNIG, E.: Mikrobiologische Charakterisierung von vier Bodenprofilen aufgrund der Populationsdichten.
Z. Pflanzenern. Bodenk. 112, 122-132 (1966)
- SCHROEDER, D. und U. SCHWERTMANN: Zur Entstehung von Eisenkonkretionen in Böden. Naturwiss. 42, 19-20 (1955)
- VAN SCHUYLENBORG, J.: Die Verlagerung von Sesquioxiden in Parabraunerden, Podsolen und sauren Braunerden.
Z. Pflanzenern. Bodenk. 114, 9-12 (1966)
- SCHWERTMANN, U.: Die fraktionierte Extraktion der freien Eisenoxide in Böden, ihre mineralogischen Formen und ihre Entstehungsweisen.
Z. Pflanzenern. Bodenk. 84, 194-205 (1959)
- SCHWERTMANN, U.: Über das Vorkommen und die Entstehung von Jarosit in Marschböden. Naturwiss. 48, 159 (1961)
- SCHWERTMANN, U.: Differenzierung der Eisenoxide des Bodens durch photochemische Extraktion mit saurer Ammoniumoxalat. Z. Pflanzenern. Bodenk. 105, 194-202 (1964)
- SCHWERTMANN, U.: Zur Goethit- und Hämatitbildung aus amorphen Eisen (III)-hydroxid. Z. Pflanzenern. Bodenk. 108, 37-45 (1965)
- SINGH-VERMA, S.B.: Zum Problem des quantitativen Nachweises der Mikroflora des Bodens mit der Methode Koch.
Diss., Univ. Giessen (1964)
- SIRNEY, R.J., BRACKHAN, O.R., M. KLINGSØYER and C.A. ELVEHJEM: Effects of potassium and sodium in microbiological assay media. J. Bact. 68, 103-109 (1954)
- SIUTA, J.: Effect of the gleying process on the development of morphological and chemical properties of soil profiles. Roczn. Glebozn. 10, 367-395 (1960);
Ref. Soil and Fert. 25, nr. 841 (1962)
- SMIRNOVA, N.N.: Hydro-physical and oxidation-reduction properties of temporarily waterlogged arable dernopodzolic soils. Trudy vsesoyuz. nauch.-issled. Inst. Udobr. Agropchoved. 40, 5-25 (1962); Russ. zit. aus Biogeography on oxidation-reduction potentials in soils. Commonwealth Bur. Soils Paper no. 538, Harpenden (1962 - 1965)
- SMITH, N.R. and V.T. DAWSON: The bacteriostatic action of rose bengal in media used for plate counts of soil fungi.
Soil Sci. 58, 467-471 (1944)

- SMITH, N.R., GORDON, R.N. and F.E. CLARK: Aerobic sporeforming bacteria.
U.S. Dept. Agric., Agriculture Monogr. no. 16,
Washington, D.C. (1952)
- SNIDER, H.J.: Manganese in some Illinois soils and crops.
Soil Sci. 56, 187-192 (1943)
- Soil Classification, a comprehensive system, 7th approximation. U.S. Dept. of
Agric. 1960: zit. nach
- SCHROEDER, D.: Zur Klassifizierung hydromorpher Böden.
Z. Pflanzenern. Bodenk. 116, 199-207 (1967)
- SPICHER, G.: Untersuchungen über die Wirkung von Erdextrakt
und Spurenelementen auf das Wachstum verschiede-
ner Streptomyceten. Zbl. Bakt. II, 108, 577-587
(1955)
- STARKEY, R.L. and H.O. HALVORSON: Studies on the transformation of iron
in nature. Soil Sci. 14, 381-402 (1927)
- STARKEY, R.L.: Transformation of iron by bacteria in water.
J. Amer. Water Works Assoc. 37, 963-984 (1945)
- STARKEY, R.L.: Oxidation and reduction of sulfur compounds in soils.
Soil Sci. 101, 297-306 (1966)
- STEFANIC, G.: Determination of the total error limitits in soil
microflora quantitative analysis.
Symp. Meth. Soil Biol. Bucharest, p. 29-34 (1965)
- STINGĂ, N., F. SILVA, and V. BLĂNARU: Some processes characteristic of
the evolution of gleying.
Com. Acad. Rep. Pop. Rom. 10, 1149-1155 (1960)
- STEUR, G.G.L.: Aard en opzet van het Nederlandse systeem van
bodemclassificatie. Landbouwk. Tijdschr. 71,
Bodemclassificatienummer, 744-753 (1959)
- STOUTHAMER, A.H.: Nitrate Reduction in Aerobacter aerogenes.
Part I and II. Arch. Mikrobiol. 56, 68-80 (1967)
- STRAUZ, W.: Einfluß des Wasserhaushaltes auf die Bodentypen-
entwicklung im Löß, Diss. T.H. Hannover (1962):
zit. nach SCHWERTMANN, U. (1964)
- SKVORTSOV, A.F.: Gley formation and physical properties of soils.
Pochvovedenie 11, 97-104 (1957);
Russ. mit engl. zusamm.

- SYROCKI, A.V., J.E. FULLER and R.L. FRANCE: Acid production by the Escherichia - Aerobacter group of bacteria as indicated by dissolved metallic iron. J. Bact. 33, 185-192 (1937)
- TAKAI, Y., T. KOYAMA and T. KAMURA: Microbiological studies on the reduction process of paddy soils. 6th Intern. Congr. Soil Sci., Paris, Vol. C, 527-532 (1956)
- TAKAI, Y., T. KOYAMA and T. KAMURA: Microbial metabolism in reduction process of paddy soils. III. Effect of iron and organic matter on the reduction process. Soil Sci. Plant Nutr. 9, 207-211 (1963)
- TAYLOR, J.: The estimation of numbers of bacteria by tenfold dilution series. J. appl. Bact. 25, 54-61 (1962)
- TAYLOR, R.M. and A.M. GRALEY: The influence of ionic environment on the nature of iron oxides in soils. J. Soil Sci. 18, 341-349 (1967)
- UNGER, H.: 2, 3, 5-Triphenyl Tetrazoliumsals als Hilfsmittel bei der Keimzählung nach dem Kochschen Gußplatten-Verfahren. Arch. Mikrobiol. 32, 20-24 (1958)
- VENABLES, W.A., J.W.T. WIMPENNY und J.A. COLE: Enzymic properties of a mutant of Escherichia coli K12 lacking nitrate reductase. Arch. Mikrobiol. 63, 117-121 (1968)
- VOLOBUYEV, V.R.: Principles of genetic classification of soils. Soviet Soil Sci. 12, 1237 (1964)
- WAGNER, M.: Vorkommen und Rolle oxalatverwertender Mikroorganismen bei Verwitterungsprozessen. Z. allg. Mikrobiol. 6, 197-209 (1966)
- WARCUP, J.H.: Methods for isolation and estimation of activity of fungi in soil. in: The ecology of soil fungi. Liverpool Univ. Press, 8, 3-21 (1960)
- WATERMANN, W.D.: Factors determining the colors of red and green shales. Master's Thesis, Kansas State University, Manhattan, (1951)
- WEINBERG, E.D.: Selective inhibition of microbial growth by the incorporation of triphenyl tetrazolium chloride in culture media. J. Bact. 66, 240-242 (1953)
- WEYL, R.: Geologische Führer durch die Umgebung von Giessen. Mittelhessische Druck- und Verlagsgesellschaft mbH., Giessen, S. 137 (1967)

WILLIAMS, S.T. and F.L. DAVIES: Use of antibiotics for selective isolation and enumeration of actinomycetes in soil.
J. gen. Microbiol. 38, 251-261 (1965)

WOLF, J. and A.N. BARKER: The genus Bacillus: Aids to the identification of its species. in: GIBBS, B.M. and D.A. SHAPTON. Identification methods for microbiologists. Part B, Acad. Press, London, p. 93-109 (1968)

YAMANAKA, K. und S. MOTOMURA: Studies on the gley formation of soils. On the mechanism of the formation of active ferrous iron in soils. Soil Plant Food, 5, 134-140 (1959).

CURRICULUM VITAE

Johannes C.G. Ottow wurde am 4. September 1935 in Madioen, Indonesien, als Sohn von Elisabeth Ottow-Kaiser und Ir. Aart Ottow, Oberforstinspektor a.D., geboren. Nach Repatriierung in die Niederlande (1946) besuchte ich in Zeist die Volks- und Oberschule. Im September 1955 erfolgte die Einberufung zum Garderegiment der Infanterie, und bekam eine Ausbildung zum Unteroffizier.

Das Studium der Landwirtschaft begann ich im September 1957 an der Rijks Hogere Landbouwschool (Agrarische Ingenieurschule) zu Deventer, wo ich im Juli 1960 die Diplomprüfung in der Richtung tropische Landwirtschaft bestand.

Im W.S. 1960/61 immatrikulierte ich mich an der Landwirtschaftlichen Hochschule in Wageningen, wechselte aber im W.S. 1961/62 zur Landwirtschaftlichen Fakultät der Justus Liebig-Universität Giessen über. Im Verlauf meines Studiums legte ich das propädeutische Examen, die Zwischenprüfung sowie die Hauptprüfung I. und II. Teil ab. Im August 1965 wurde das Diplomexamen in der Studienrichtung I "Pflanzenproduktion" (Nebenfach Mikrobiologie) abgelegt.

Während der Sommerferien meines Studiums habe ich meine Praxis an mehreren Landwirtschaftlichen Versuchsanstalten absolviert und zwar chronologisch in Frankreich, den Niederlanden, Italien und der Schweiz.

Zur Spezialisierung in der Mikrobiologie immatrikulierte ich mich im W.S. 1965 an der Kansas State University, Department of Bacteriology, Manhattan, Kansas, wo ich im August 1966 den Master of Science (in bacteriology) erwarb.

Nach meiner Rückkehr im Oktober 1966 erhielt ich einen Forschungsauftrag der Deutschen Forschungsgemeinschaft, Bad Godesberg, und konnte damit den experimentellen Teil meiner Dissertation am Institut für Landwirtschaftliche Mikrobiologie der Universität Giessen durchführen. Im September 1967 absolvierte ich am Institut Pasteur, Paris, den Fortbildungskurs "microbiologie du sol".

Schreibdruck in Spezialschrift

Chemoprint^{OHG}

Gießen